

# Utjecaj BMP-2, BMP-6 i fluoksetina na ekspresiju diferencijacijskih biljega osteoblasta u kulturi stanica MC3T3-E1

---

Martinčić, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:784637>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Nikolina Martinčić**

**Utjecaj BMP-2, BMP-6 i fluoksetina na  
ekspresiju diferencijacijskih biljega osteoblasta u  
kulturi stanica MC3T3-E1**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Klinička biokemija organa i organskih sustava 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Laboratoriju za mineralizirana tkiva, Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Donatelle Verbanac i suvoditeljstvom akademika Slobodana Vukičevića.

Najljepše zahvaljujem mentorima izv. prof. dr. sc. Donatelli Verbanac i akademiku Slobodanu Vukičeviću na pruženoj prilici i podršci, te dr. sc. Veri Kufner i dr. sc. Tatjani Bordukalo Nikšić na pomoći u izvedbi eksperimenta i izradi rada.

# Sadržaj

|  |    |
|--|----|
| Uvod .....   | 1  |
| Osteoblasti .....                                    | 1  |
| Koštani morfogenetski proteini .....                 | 3  |
| Serotonin i fluoksetin .....                         | 5  |
| Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu ..... | 6  |
| Objašnjenje teme .....                               | 8  |
| Materijali i metode .....                            | 9  |
| Materijali .....                                     | 9  |
| Uzgoj i tretiranje stanica .....                     | 10 |
| Izolacija RNA .....                                  | 11 |
| Reverzna transkripcija .....                         | 11 |
| PCR u stvarnom vremenu .....                         | 12 |
| Obrada rezultata PCR-a u stvarnom vremenu .....      | 13 |
| Bojanje na alkalnu fosfatazu .....                   | 13 |
| Bojanje metodom Von Kossa .....                      | 14 |
| Rezultati .....                                      | 15 |
| Rasprava .....                                       | 29 |
| Zaključak .....                                      | 33 |
| Literatura .....                                     | 34 |
| Sažetak .....  | 39 |
| Summary .....  | 40 |
| Popis kratica .....                                  | 41 |

# Uvod

## *Osteoblasti*

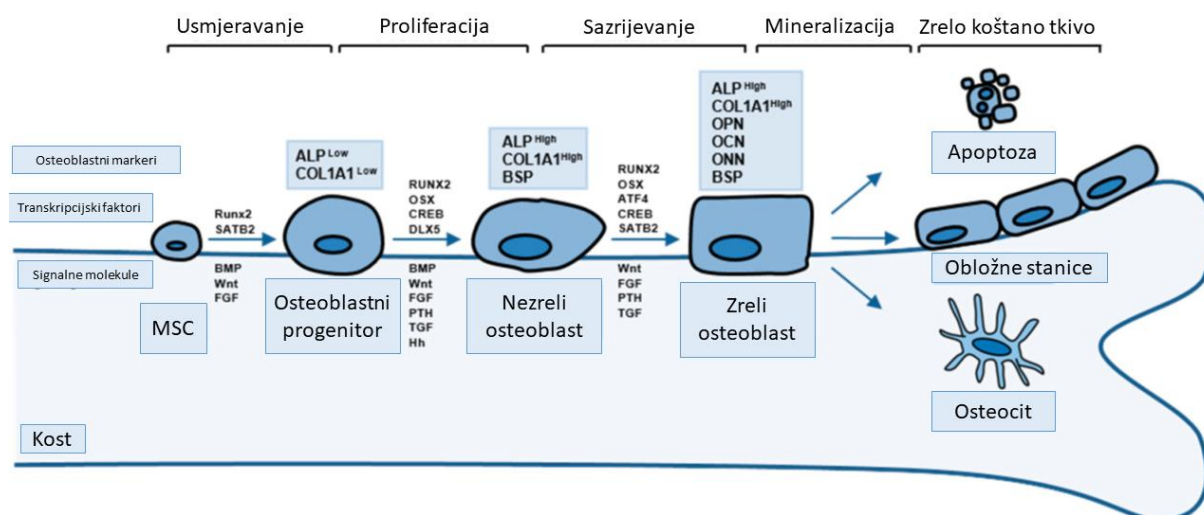
Osteoblasti su male mononuklearne stanice, obično kuboidnog oblika, iako mogu biti i morfološki različitog, kružnog, plosnatog ili cilindričnog oblika, koje potječu od mezenhimalnih matičnih stanica (MSC, od engl. *mesenchymal stem cell*), a glavna uloga im je tvorba kosti (Amarasekara i sur., 2021). Osim što tvore novo koštano tkivo, osteoblasti u sprezi s osteoklastima, stanicama koje resorbiraju kost, sudjeluju i u remodeliranju kosti (Katsimbri, 2017).

Progenitorske stanice osteoblasta prolaze kroz tri stadija razvoja: staničnu proliferaciju, sekreciju izvanstaničnog matriksa (ECM, od engl. *extracellular matrix*) i sazrijevanje matriksa, te mineralizaciju matriksa (Amarasekara i sur., 2021). Nakon usmjerenja u osteoblastnu liniju, preosteoblasti proliferiraju i eksprimiraju kolagen, fibronektin, osteopontin (OSN) i transformirajući čimbenik rasta beta (TGF- $\beta$ ) (Amarasekara i sur., 2021). Osteopontin je glikozilirani fosfoprotein kojeg eksprimiraju osteoblasti, osteociti i odontoblasti, a čije funkcije uključuju: poticanje formacije kosti i mineralizacije, vezanje za stanice i komponente ECM uključujući hidroksiapatit, regulaciju formiranja i remodeliranja mineraliziranih tkiva, novačenje i stimulaciju makrofaga i limfocita kao dio nespecifičnog odgovora na infekciju mikroorganizmima, uključen je u proces stanične migracije, veže kalcij, te utječe na ekspresiju gena i stvaranje dušikovog oksida (Lin i sur., 2020; Denhardt i Guo, 1993). Fibronektin je protein koji u ljudi postoji u 20 različitih izoformi s različitim afinitetom prema ligandima, staničnom adhezivnošću i topljivošću, pri čemu su dva glavna oblika topljivi, kojeg proizvode hepatociti i u velikim količinama se nalazi u krvnoj plazmi (300 mg/L), i slabije topljiv oblik, kojeg sintetiziraju i izlučuju razne stanice, te se ugrađuje u ECM (Parisi i sur., 2020; Pankov i Yamada, 2002). Njegovo najvažnije obilježje je vezanje za integrine čime utječe na ponašanje stanica uključujući adheziju, širenje, migraciju, proliferaciju i diferencijaciju (Parisi i sur., 2020), ali se također veže i na heparin, kolagen, želatin i fibrin (Pankov i Yamada, 2002). Transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  ima različit učinak na različite stadije diferencijacije, u ranijim stadijima razvoja osteoblasta potiče proliferaciju, potiče diferencijaciju progenitora osteoblasta u osteoblaste, sprječava apoptozu i privlači prekursore osteoblasta i osteoblaste koji proizvode matriks (Kasagi i Chen, 2013; Balooch i sur., 2005). U kasnijim stadijima, TGF- $\beta$  inhibira proliferaciju osteoblasta i mineralizaciju, tada ulogu pozitivnog regulatora preuzimaju koštani morfogenetski proteini

(BMP, od engl. *bone morphogenetic protein*) koji su isto članovi TGF- $\beta$  nadobitelji (Kasagi i Chen, 2013). Također regulira koštanu masu, mehanička svojstva i sastav koštanog matriksa (Balooch i sur., 2005). Kolagen je glavna sastavnica vezivnih tkiva životinja i do danas je poznato 28 različitih tipova u kralježnjaka i viših beskralježnjaka (Varma i sur., 2016). Kolagen tip I čini 80-90% ukupnih proteina prisutnih u kosti, a prisutni su u malim količinama i kolagen tipa III i V (Garnero, 2015). Funkcija kolagena je mehanička potpora i uloga skele za koštane stanice (Lin i sur., 2020).

RUNX2 je ključan transkripcijski faktor za usmjerenje MSC u osteoplastnu lozu, a osim što utječe na diferencijaciju, potiče i proliferaciju progenitora osteoblasta (Kawane i sur., 2018). Deficijencija RUNX2 kod ljudi uzrokuje kleidokranijalnu displaziju (Wu i sur., 2016). RUNX2 nizvodno regulira sintezu transkripcijskog faktora osterix koji je esencijalan za sazrijevanje osteoblasta i razvoj kosti (Sinha i Zhou, 2013). U drugom stadiju razvoja osteoblasta proliferacija je umanjena zbog utjecaja osterixa, a nezreli osteoblasti diferenciraju se u zrele osteoblaste i izlučuju kolagen tipa 1 alfa 1 lanac (COL1A1) kao većinsku sastavnicu ECM-a i ekspimiraju alkalnu fosfatazu (ALP, od engl. *alkaline phosphatase*) kako bi izvanstanični matriks sazrio (Amarasekara i sur., 2021; Zhang, 2010). Tkivno nespecifična alkalna fosfataza je glikozil-fosfatidilinozitol (GPI, od engl. *glycosylphosphatidylinositol*) sidrima vezana na membranu hondrocita, osteoblasta i odontoblasta, a pretpostavljeni fiziološki supstrati su joj pirofosfat, piridoksal 5'-fosfat i fosfoetanolamin (Orimo, 2010). Kad ECM u potpunosti sazrije slijedi mineralizacija koju prati ekspresija raznih osteoplastnih markera poput OSN, osteokalcina (OCN) i koštanog sijaloproteina (BSP, od engl. *bone sialoprotein*), uz kontinuiranu ekspresiju ALP i COL1A1 (Amarasekara i sur., 2021). Osteokalcin je faktor kojeg ekspimiraju i izlučuju isključivo osteoblasti (Moser i van der Eerden, 2019). Smatra se koštanim hormonom koji djeluje kao efektor pozitivne povratne sprege u regulaciji raznih procesa poput sinteze dopamina, serotonina, norepinefrina, inzulina i testosterona, iako postoje i oprečna mišljenja o postojanju efekata povrha onih na kosti tj. djelovanja na usmjerenje kristala hidroksiapatita (Manolagas, 2020; Moser i van der Eerden, 2019; Zoch i sur., 2017). BSP sudjeluje u mineralizaciji i prijanjanju stanica na mineralizirani matriks, te čini 8-12% nekolagenskih proteina kosti i zubne cakline (Ganss i sur., 1999).

Na kraju, zreli osteoblasti podliježu apoptozi, postaju obložne stanice kosti ili se ugrađuju u koštani matriks kao terminalno diferencirani osteociti (Amarasekara i sur., 2021). Osterix sudjeluje u sazrijevanju i funkciji osteocita aktivacijom gena *Sost*, *Dmpl* i *Phex* koji su specifični za osteocite (Sinha i Zhou, 2013). Na Slici 1 shematski je prikazana diferencijacija osteoblasta.



Slika 1. Shematski prikaz diferencijacije osteoblasta. (MSC – mezenhimska matična stanica, BMP – koštani morfogenetski protein, FGF – faktor rasta fibroblasta, RUNX2 – runtun srodan transkripcijski faktor 2, PTH – paratiroidni hormon, TGF – transformirajući čimbenik rasta, Hh – hedgehog, SATB2 – specijalni protein, koji veže slijedove bogate AT, 2, OSX – osterix, ATF4 – aktivacijski transkripcijski faktor 4, CREB – protein koji veže cAMP responsivni element, ALP – alkalna fosfataza, OPN – osteopontin, OCN – osteokalcin, ONN – osteonektin, BSP – koštani sijaloprotein, COL1A1 – kolagen tip 1 alfa 1 lanac.) Preuzeto iz (Amarasekara i sur. 2021).

Stanice MC3T3-E1 su linija mišjih stanica preosteoblastnog fenotipa porijeklom iz kostiju lubanje (Czekanska i sur., 2012). Za mineralizaciju matriksa u kulturi je nužna askorbinska kiselina u koncentraciji 25-50 mg/L i  $\beta$ -glicerofosfat u koncentraciji 5-10 mM (Czekanska i sur., 2012). Prednosti ove linije kao modela osteoblasta su neograničen broj stanica, homogen karakter, fenotipska diferencijacija iz preosteoblasta u zreli osteoblast i brzina rasta slična ljudskim osteoblastima, dok nedostaci uključuju razlike u usporedbi s ljudskim osteoblastima i neke znakove replikacijskog starenja (Czekanska i sur., 2012).

### *Koštani morfogenetski proteini*

Koštani morfogenetski proteini (BMP) su višefunkcionalni citokini u koje ubrajamo preko 20 članova TGF- $\beta$  nadobitelji, a djeluju kao potentni regulatori tijekom embriogeneze i razvoja i popravka kosti i hrskavice (Halloran i sur., 2020; Carreira i sur., 2014). U kostima, koštane morfogenetske proteine proizvode i izlučuju: osteoprogenitorske stanice, osteoblasti, hondrociti, trombociti, endotelne stanice, hematopoetske matične stanice i koštane

mezenhimske matične stanice (Carreira i sur., 2014; Vukicevic i Grgurevic, 2009). Nakon izlučivanja privremeno se spremaju u ECM i oslobađaju prilikom popravka ili remodeliranja kosti (Carreira i sur., 2014; Vukicevic i Grgurevic, 2009). BMP-2, -4, -5, -6, -7 i -9 pokazuju snažnu osteogenu aktivnost, dok BMP-3 ima suprotan učinak (Wu i sur., 2016). BMP-i se vežu kao dimeri na dva BMP receptora tipa I i dva BMP receptora tipa II (Salazar i sur., 2016). BMP receptori tipa I i II jedine su poznate klase transmembranskih receptora u ljudi na površini stanice sa serin/treonin kinaznom aktivnosti (Salazar i sur., 2016). Intrinzične kinaze fosforiliraju SMAD proteine koji sadrže domenu koja selektivno veže određeni slijed DNA i nuklearni lokalizacijski signal (Salazar i sur., 2016). BMP-2 i -6 mogu se vezati na receptore tipa I: ALK1, ALK2, ALK3, ALK6, te tipa II: ACVR2A, ACVR2B, BMPR2, AMHR2, a signalizacija se nastavlja preko SMAD1/5/8 koji tvori kompleks sa SMAD4, te ulazi u jezgru gdje se veže za DNA (Salazar i sur., 2016; Otsuka, 2013). SMAD1/5/8 SMAD4 kompleks potiče ekspresiju RUNX2 s kojim zatim ulazi u kompleks i inicira ekspresiju drugih osteoblastnih gena (Wu i sur., 2016). BMP-3 signalizacija provodi se preko SMAD2/3 čime postiže svoj učinak suprotan drugim proteinima BMP (Wu i sur., 2016). Poznat je i ne-SMAD put signalizacije preko TAK1-MKK-MAPK koji također ima učinak na razvoj kosti i osteogensku diferencijaciju (Wu i sur., 2016). MAP kinaze fosforilacijom potiču transkripcijsku aktivnost brojnih osteoblastnih transkripcijskih faktora uključujući RUNX2, DLX-5 i osterix, te pojačavaju BMP-SMAD signalizaciju poticanjem interakcije između RUNX2 i SMAD kompleksa, tj. SMAD i ne-SMAD signalni put djeluju sinergistički (Wu i sur., 2016).

BMP-6 je potentni regulator diferencijacije MSC u osteoblaste, a kao produkt osteoklasta je ključan faktor sprege resorpcije i formacije kosti jer novači osteoblaste na mjesto resorpcije (Vukicevic i Grgurevic, 2009). Izvan koštanog sustava, BMP-6 regulira serumske razine glukoze i održava koncentraciju željeza u serumu poticanjem ekspresije hepcidina (Vukicevic i Grgurevic, 2009). *Bmp6*<sup>-/-</sup> miševi se rađaju živi i fertilni su, ali pate od odgođenog razvoja kostiju, smanjenog broja Langerhansovih otočića u gušterači i fenotipa nalik nasljednoj hemokromatozi (Vukicevic i Grgurevic, 2009). Za razliku od BMP-2 i BMP-7, za BMP-6 je karakteristično da osim što potiče diferencijaciju i aktivnost osteoblasta, ne potiče diferencijaciju i aktivnost osteoklasta, čime se gubi ravnoteža između formacije i resorpcije kosti u korist formacije kosti (Vukicevic i Grgurevic, 2009). Autologni krvni ugrušak s dodanim rekombinantnim humanim BMP-6 se koristi za induciranje izgradnje nove kosti u kliničkim ispitivanjima (Vukicevic i sur., 2020; [www.cordis.europa.eu](http://www.cordis.europa.eu)).



BMP-2 ima izuzetno raznovrsne uloge: tijekom razvoja promovira kardiogenezu, neurogenezu, razvoj očnog sustava i dorzo-ventralne i anterio-posteriorne osi, dok u odrasloj dobi inducira endohondralnu i intramembransku osifikaciju, aktivaciju adipogenih i hondrogenih signalnih putova, te sudjeluje u održavanju neurona, pluća i srčanog tkiva (Halloran i sur., 2020). Zbog izuzetne važnosti ovog proteina i raznovrsnih uloga, *Bmp2*<sup>-/-</sup> genotip je letalan za organizam (Salazar i sur., 2016). BMP-2 izrazito povećava ekspresiju osteokalcina i kratkotrajna ekspresija BMP-2 je nužna i dovoljna za ireverzibilno pokretanje izgradnje kosti (Wu i sur., 2016). Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (FDA, od engl. *Food and Drug Administration*) odobrila je upotrebu BMP-2 tijekom anteriornih lumbarnih interkorporalnih fuzija, kranioplastike i maksilofacijalnih rekonstruktivnih operacija, a također se intenzivno istražuje primjena u brojnim drugim područjima (Halloran i sur., 2020).

### *Serotonin i fluoksetin*

Serotonin, odnosno 5-hidroksitriptamin, je neurotransmiter za kojeg postoje receptori u svim regijama mozga i to raznih subtipova čime postiže različite učinke i modulira gotovo sve bihevioralne procese kod ljudi (Berger i sur., 2009). Monoaminska hipoteza patologije depresije uzrokom depresije smatra upravo manjak serotonina, dopamina i noradrenalina (Malhi i Mann, 2018). Međutim, velika većina serotonina sintetizira se i nalazi upravo izvan središnjeg živčanog sustava, gdje sudjeluje u regulaciji: krvnog tlaka i vaskularnog otpora, hemostaze i funkcije trombocita, aspekata srčane funkcije, kontrole disanja, brzine metabolizma i tjelesne temperature, probave, boli, i genitourinarne funkcije (Berger i sur., 2009). Serotonin ne može prelaziti krvno-moždanu barijeru što ga u tijelu strogo dijeli u dva odjeljka u kojima može ispoljavati različite učinke (Ducy i Karsenty, 2010). U mozgu, živčani putevi koji utječu na gustoću kostiju su inicirani serotonergičnim putevima od moždanog debla do hipotalamusa što u konačnici dovodi do poticanja nakupljanja koštane mase oslobađanjem kosti inhibicijskog utjecaja simpatičkog sustava (Lavoie i sur., 2017). Utjecaj perifernog serotonina na kosti je nedvojbjen, ali narav njegovog učinka je diskutabilna jer različiti eksperimenti pokazuju oprečne rezultate (Lavoie i sur., 2017; Walsh i sur., 2013; Ducy i Karsenty, 2010). Osteoblasti, osteoklasti i osteociti ekspimiraju triptofan-hidroksilazu 1, enzim nužan za sintezu serotonina, a također ekspimiraju i funkcionalne transportere serotonina i serotoninske receptore uključujući 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> i 5-HT<sub>2B</sub>. (Lavoie i sur., 2017; Sansone i Sansone, 2012).

Fluoksetin je lijek indiciran za liječenje velikih depresivnih epizoda, opsesivno-kompulzivnog poremećaja i bulimije (HALMED, 2021). Za liječenje velikih depresivnih epizoda propisano je liječenje najmanje šest mjeseci, a za opsesivno-kompulzivni poremećaj *ad infinitum* uz uvjet da je unutar 10 tjedana opaženo poboljšanje (HALMED, 2021). Mehanizam djelovanja fluoksetina, kao člana skupine lijekova selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina (SSRI, od engl. *selective serotonin reuptake inhibitor*), temelji se na inhibiciji 5-hidroksitriptaminskog prijenosnika (5HTT) koji služi za ponovnu pohranu serotonina, a eksprimiran je na presinaptičkim neuronima, čime se postiže pojačana serotoninska signalizacija (Ortuño i sur., 2017). Prema Sažetku opisa svojstava lijeka objavljenog od strane HALMED-a (HALMED, 2021): "*Epidemiološke studije, provedene uglavnom kod bolesnika u dobi od 50 i više godina, pokazale su povećani rizik od prijeloma kostiju u bolesnika koji su primali SSRI-e i tricikličke antidepressive. Mehanizam koji do toga dovodi nije poznat. ... U pedijatrijskim kliničkim ispitivanjima liječenje fluoksetinom je bilo povezano i sa smanjenjem razine alkalne fosfataze.*" Pozitivna korelacija između terapije fluoksetinom i smanjene mineralne gustoće kostiju ili povećanog rizik od loma kostiju ili gubitka koštane mase, je pokazana u brojnim kliničkim ispitivanjima i na modelima glodavaca (Ferroni i sur., 2019; Ortuño i sur., 2017).

### *Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu*

Lančana reakcija polimeraze (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) je enzimska metoda umnožavanja određenog slijeda DNA cikličkom promjenom temperature reakcijske smjese (Green i Sambrook, 2019). Za reakciju je potreban kalup DNA, par početnica, deoksiribonukleotid trifosfati, termostabilna *Taq* polimeraza, magnezijevi ioni, pufer i jednovalentni kationi (Green i Sambrook, 2019). Svaki ciklus reakcije se sastoji od denaturacije DNA lanaca pri temperaturi  $> 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ , prijanjanja početnica pri temperaturi otprilike  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  nižoj od temperature topljenja početnica tj.  $45 - 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , te ekstenzije pri temperaturi  $55 - 70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Green i Sambrook, 2019). Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (RT-PCR, engl. *real-time polymerase chain reaction*) je specifična izvedba lančane reakcije polimeraze kojom je omogućena kvantifikacija produkta dok je reakcija još u tijeku (Arya i sur., 2005). U reakcijsku smjesu je za kvantifikaciju potrebno dodati agense koji se interkaliraju u DNA poput etidijevog bromida i SYBR<sup>®</sup> Green, ili DNA sonde s fluorescentnom bojom i prigušivačem (Arya i sur., 2005). Interkalirajući agensi fluoresciraju samo kad su interkalirani u dvolančanu DNA i na taj način je fluorescencija proporcionalna

količini dvolančane DNA u uzorku, dok se upotrebom DNA sonde fluorescencija opaža kad polimeraza egzozonukleaznom aktivnošću razgradi sondu na nukleotide pri čemu se fluorescentna boja odvoji od prigušivača i fluorescencija postaje vidljiva (Arya i sur., 2005). Kako bi kvantificirali DNA određuje se broj reakcijskih ciklusa ( $C_t$ ) potrebnih da razina fluorescencije prijeđe unaprijed postavljen prag (engl. *threshold*), a zatim se vrijednosti normaliziraju s obzirom na referentni gen čija je ekspresija postojana (Arya i sur., 2005).

## Obrazloženje teme

Prema podacima svjetske zdravstvene organizacije, u svijetu preko 264 milijuna ljudi boluje od depresije (WHO, 2020). Sukladno kliničkim smjernicama, fluoksetin spada u skupinu lijekova prvog izbora za liječenje depresije (Begić i sur., 2020). Poznato je da terapija fluoksetinom može povećati rizik od loma kostiju (HALMED, 2021). Svrha ovog rada je ispitati učinak fluoksetina na diferencijaciju osteoblasta u *in vitro* uvjetima kako bi se utvrdilo je li povećan rizik od loma kostiju posljedica fluoksetinom izazvane inhibicije diferencijacije osteoblasta i može li se eventualni učinak fluoksetina prevladati dodavanjem koštanih morfogenetskih proteina BMP-2 ili BMP-6 u stanični medij.

## Materijali i metode

### *Materijali*

#### Uzgoj stanica:

- Gibco MEM Alpha (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, SAD)
- goveđi fetalni serum
- otopina antibiotika i antimikotika (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- $\beta$ -glicerofosfat
- vitamin C
- ploče za uzgoj stanica formata 24 jažice (Corning Incorporated, Kennebunk, SAD)
- boce za uzgoj stanica T75
- Neubauerova komora
- Tripan plavilo
- rekombinantni humani BMP-2
- rekombinantni humani BMP-6
- fluoksetin
- fosfatni pufer (PBS, engl. phosphate buffer saline)

#### Izolacija mRNA, reverzna transkripcija, RT-PCR:

- TRIzol
- kloroform
- DEPC-tretirana voda
- 75% etanol
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, (Applied Biosystems, Massachusetts, SAD)
- TE pufer
- TaKaRa SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (cat. no. #RR820A, Shiga, Japan)
- oligonukleotidne početnice specifične za pojedine gene (Tablica 1)

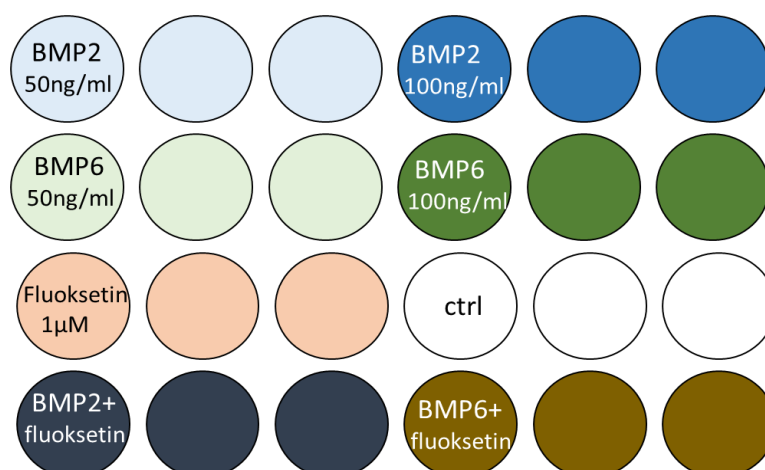
#### Bojanja:

- Alkaline phosphatase (AP), leukocyte (Procedure No. 86) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, SAD)
- apsolutni alkohol
- srebrov nitrat
- natrijev sulfit

## Uzgoj i tretiranje stanica

Stanice linije MC3T3-E1 su odmrznute i nasađene u bocu za uzgoj stanica T75 s medijem koji se sastoji od Gibco MEM Alpha (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, SAD), goveđeg fetalnog seruma (FBS, od engl. *fetal bovine serum*) u konačnoj volumnoj koncentraciji 10 % i smjese antibiotika Antibiotic Antimycotic Solution (100x) Stabilized (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) u konačnoj masenoj koncentraciji 1 %. Stanice su presađivane i umnožavane do postizanja dovoljnog broja pogodnog za nasađivanje na ploče.

Na tri ploče za uzgoj stanica formata 24 jažice su nasađene stanice koje su prošle između 27 i 29 pasaža. U svaku jažicu nasađeno je 100 000 stanica u 500  $\mu$ L medija. Broj stanica je određen brojanjem u Neubauerovoj komori s Tripan plavilom. Četvrti dan od nasađivanja promijenjena je polovica medija u svakoj jažici. Sedmi, deseti, četrnaesti, te šesnaesti dan od nasađivanja stanicama je prilikom promjene medija dodan diferencijacijski medij (medij s 10 mM  $\beta$ -glicerofosfatom i 50  $\mu$ g/mL vitamina C) s posebnim tretmanima za svaku skupinu. Prva skupina tretirana je s BMP-2 koncentracije 50 ng/mL, druga s BMP-2 koncentracije 100 ng/mL, treća s BMP-6 koncentracije 50 ng/mL, četvrta s BMP-6 koncentracije 100 ng/mL, peta s fluoksetinom koncentracije 1  $\mu$ M, šesta kombinacijom BMP-2 koncentracije 100 ng/mL i fluoksetina koncentracije 1  $\mu$ M, sedma kombinacijom BMP-6 koncentracije 100 ng/mL i fluoksetina koncentracije 1  $\mu$ M, a posljednja skupina je kontrolna i njoj se ne dodaje poseban tretman. Istom tretmanu podvrgavaju se stanice u tri jažice na svakoj ploči. Raspored na ploči skupina tretiranih različitim tretmanima prikazan je na Slici 2.



Slika 2. Prikaz ploče za uzgoj stanica formata 24 jažice i tretmanima koji su korišteni za svaku jažicu. Kod kombinacija BMP i fluoksetina korištene su koncentracije BMP-a 100 ng/mL, a fluoksetina 1  $\mu$ M. (ctrl – kontrola).

## *Izolacija RNA*

Osamnaesti dan od nasadivanja stanica, medij je uklonjen i stanice su isprane PBS-om. Zatim su raspodijeljena 2 mL TRIzola na tri jažice sa stanicama podvrgnutim istom tretmanu. Stanice se liziraju provlačenjem kroz pipetu, a potom se sadržaj jažica prenosi u dvije mikroeprevete, po 1 mL u svaku, tako je za svaku tretiranu skupinu dobiven duplikat, tj. u daljnjoj obradi imamo 16 uzorka. Uzorci se pohranjuju se na -80 °C do nastavka izolacije.

Uzorci se odmrzavaju inkubacijom pri sobnoj temperaturi i u svaki se dodaje 200 µL kloroforma, čvrsto se zatvore i 15 sekundi dobro protresu rukom. Uzorci se inkubiraju u trajanju od 2-3 minute na sobnoj temperaturi, a zatim se centrifugiraju na 12000 g 15 minuta pri 4 °C. Centrifugiranjem se uzorak razdvaja u crvenu fenol-kloroform fazu na dnu, interfazu – bijeli prsten, i bezbojnu vodenu fazu na vrhu u kojoj se nalazi RNA. Vodena faza se premješta u novu mikroeprevetu i dodaje joj se 500 µL izopropanola. Uzorci se promiješaju laganim inverznim okretanjem i inkubiraju 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Slijedi ponovno centrifugiranje na 12000 g 10 minuta pri 4 °C, nakon kojeg je na dnu vidljiv bijeli talog RNA. Supernatant se uklanja odlijevanjem te se talog ispire s 1 mL 75 % etanola. Uzorci se kratko promiješaju na vibracijskoj miješalici kako bi se talog odvojio od stijenke i centrifugiraju na 7500 g 5 minuta pri 4 °C. Supernatant se uklanja pipetom i talog se kratko posuši na 37 °C. Zatim se talog RNA otapa u 20 µL DEPC-tretirane vode. Uzorci se promiješaju i kratkim centrifugiranjem obore na dno epruvete. 2 µL uzorka se razrjeđuje u 98 µL DEPC-tretirane vode. Razrjeđeni uzorci se promiješaju i kratkim centrifugiranjem obore na dno epruvete. Na spektrofotometru se određuje koncentracija razrjeđenih uzoraka kako bi se mogao izračunati volumen uzorka za reverznu transkripciju. Uzorci RNA se pohranjuju na -80 °C do reverzne transkripcije.

## *Reverzna transkripcija*

RNA je prevedena u cDNA pomoću kompleta za reverznu transkripciju High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, (Applied Biosystems, Massachusetts, SAD). Protokol je prilagođen transkripciji 1 µg RNA u 20 µL reakcijske smjese. Po završetku reakcije dobivena cDNA je razrijeđena TE puferom u omjeru 1:1. Polovica tako razrijeđenog uzorka je dodatno razrijeđena TE puferom u omjeru 1:5, te je tako dobivena otopina korištena za PCR u stvarnom vremenu. Do izvođenja PCR-a cDNA je pohranjena pri -20 °C.

## PCR u stvarnom vremenu

Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu proveden je pomoću TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™ II (cat. no. #RR820A, Shiga, Japan) na uređaju LightCycler (Roche, Basel, Švicarska), protokol je prilagođen ukupnom volumenu reakcijske smjese 10 µL. Kao referentni geni korišteni su geni koji kodiraju β-aktin (*Actb*) i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (*Gapdh*), a ispitivani su geni koji kodiraju: osteopontin, osteokalcin, osterix, RUNX2, kolagen 1A1. Slijed nukleotida početnica je naveden u Tablici 1. Za svaki uzorak PCR je proveden u duplikatu.

Tablica 1. Slijed nukleotida početnica za PCR u stvarnom vremenu. (F-forward, R-reverse)

| Ispitivan gen kodira: | Slijed:  | Izvor:                |
|-----------------------|--|-----------------------|
| GAPDH                 | F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG<br>R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA | (Pauk i sur., 2014)   |
| β-aktin               | F: GGCTGTATTCCCCTCCATCG<br>R: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT   | (Wei i sur., 2020)    |
| Kolagen 1A1           | F: CGGCTCCTGCTCCTCTTAG<br>R: GGTTTCCACGTCTCACCATT      | (Meroni i sur., 2019) |
| Osteokalcin           | F: AGACTCCGGCGCTACCTT<br>R: CTCGTCACAAGCAGGGTTAAG      | (Wei i sur., 2020)    |
| Osteopontin           | F: ACACTTTCACCTCCAATCGTCC<br>R: TGCCCTTTCCGTTGTTGTCC   | (Wei i sur., 2020)    |
| Osterix               | F: TCAGCCGCCCGATCTTCCA<br>R: CAATGGGTCCACCGCGCCAAG     | (Wei i sur., 2020)    |
| RUNX2                 | F: GAGGGACTATGGCGTCAAACA<br>R: GGATCCCAAAGAAGCTTTGC    | (Wei i sur., 2020)    |



## *Obrada rezultata PCR-a u stvarnom vremenu*

Dobivene vrijednosti Ct su normalizirane po formuli:

normalizirana vrijednost = Ct (gen od interesa) – Ct (referentni gen).

Značajnost razlike za svaki gen između pojedinih tretiranih skupina i kontrolne skupine je određena usporedbom normaliziranih vrijednosti Studentovim t-testom.  $\Delta\Delta Ct$  je izračunata kao:

$\Delta\Delta Ct$  = aritmetička sredina normaliziranih vrijednosti tretirane skupine – aritmetička sredina normaliziranih vrijednosti kontrolne skupine.

Promjena ekspresije (engl. *fold change*) je izračunata prema izrazu:

Promjena ekspresije =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Izračunate su standardne devijacije replikata svih ispitivanih gena. Standardna devijacija za svaku skupinu određena je prema izrazu :

$SD = \sqrt{[(\text{standardna devijacija referentnog gena})^2 + (\text{standardna devijacija gena od interesa})^2]}$

Izračunata je i gornja granica moguće pogreške rezultata (engl. *upper limit*) prema izrazu:

$UL = 2^{-\Delta\Delta Ct + SD}$ .

Studentovim t-testom (MS Excel, naredba T.TEST, dvokraka distribucija, jednakost varijance dvaju uzoraka) je ispitana značajnost razlike normaliziranih vrijednosti tretiranih skupina i kontrole.

## *Bojanje na alkalnu fosfatazu*

Stanice na jednoj ploči su obojane pomoću kompleta za bojanje Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, SAD) Alkaline phosphatase (AP), leukocyte (Procedure No. 86). Bojanje je izvršeno prema uputama proizvođača. Pločica se promatrala pod lupom i svaka jažica je fotografirana. Fotografije su izrezane tako da slika prikazuje samo dno jažice kako bi se uklonila refleksija s bočne stijenke jažice. Takve slike su zatim obrađene pomoću softvera ImageJ (1.53e, Wayne Rasband and contributors, National Institutes of Health, SAD). U svrhu procjene rasta stanica određen je prosječan intenzitet piksela (engl. *Mean Intensity (unweighted)*) naredbama *Analyze – Histogram*. Studentovim t-testom je ispitana značajnost razlike između prosječnih intenziteta piksela tretiranih skupina i kontrole. Relativna razlika između tretirane i kontrolne skupine izračunata je prema izrazu: (prosječan intenzitet piksela tretirane skupine – prosječan intenzitet piksela kontrole) / prosječan intenzitet piksela kontrole · 100 %. U svrhu procjene aktivnosti ALP primijenjen je prag saturacije 120 naredbama *Image – Adjust – Color Threshold – Saturation 120-255*, kako bi se iz računa

izostavila presvijetla područja jažica. Zatim se naredbama *Analyze – Tools – Color Histogram* dobiva histogram intenziteta piksela i odgovarajuće prosječne vrijednosti za svaku od tri boje: crvenu (R), zelenu (G) i plavu (B). Za svaku sliku izračunat je udio crvene boje u zbroju svih boja prema formuli:  $Udio = R / (R+G+B)$ . Relativna razlika između tretirane i kontrolne skupine izračunata je prema izrazu:  $(\text{prosjeak udjela crvene boje tretirane skupine} - \text{prosjeak udjela crvene boje kontrole}) / \text{prosjeak udjela crvene boje kontrole} \cdot 100 \%$ . Studentovim t-testom (MS Excel, naredba T.TEST, dvokraka distribucija, jednakost varijance dvaju uzoraka) je ispitana značajnost razlike između udjela crvene boje u slikama tretiranih skupina i kontrolne skupine.

### *Bojanje metodom Von Kossa*

Stanice na posljednjoj ploči obojane su po metodi Von Kossa prema sljedećem protokolu: medij se ukloni sa stanica i stanice se isperu PBS-om, a zatim se fiksiraju u apsolutnom alkoholu 10 minuta. Alkohol se ispere destiliranom vodom. U jažice se dodaje 5% otopina  $AgNO_3$  i pločica se ostavi stajati osvijetljena žaruljom od 100 W. Nakon 60 minuta, pločica se ispire destiliranom vodom i u jažice se dodaje 5 % otopina  $Na_2SO_3$ . Nakon 5 minuta pločica se ispire destiliranom vodom. Kad se pločica posuši, promatra se pod lupom i svaka jažica se fotografira. Fotografije su izrezane tako da slika prikazuje samo dno jažice kako bi se uklonila refleksija s bočne stijenke jažice. Takve slike su zatim obrađene pomoću softvera ImageJ. U svrhu procjene mineralizacije određen je prosječan intenzitet piksela (engl. *Mean Intensity (unweighted)*) naredbama *Analyze – Histogram*. Studentovim t-testom (MS Excel, naredba T.TEST, dvokraka distribucija, jednakost varijance dvaju uzoraka) je ispitana značajnost razlike između prosječnih intenziteta piksela tretiranih skupina i kontrole. Relativna razlika između tretirane i kontrolne skupine izračunata je prema izrazu:  $(\text{prosjeak intenziteta piksela tretirane skupine} - \text{prosjeak intenziteta piksela kontrole}) / \text{prosjeak intenziteta piksela kontrole} \cdot 100 \%$ .

## Rezultati

U Tablici 2 nalaze se Ct vrijednosti dobivene RT-PCR-om za sve ispitivane gene svih tretiranih skupina. P-vrijednosti studentovog t-testa dobivene usporedbom normaliziranih vrijednosti tretiranih skupina i kontrole nalaze se u Tablici 3 i Tablici 4.

Za skupinu tretiranu s BMP-2 u koncentraciji 50 ng/mL nije dobiven rezultat za kolagen 1A1 jer je PCR u stvarnom vremenu uspješno proveden za samo jedan replikat. U skupini tretiranoj s BMP-2 u koncentraciji 50 ng/mL promjena ekspresije u odnosu na kontrolu uz *Gapdh* kao referentni gen za *Runx2* povećana je 4,5× (p<0,001), *Osx* 3,6× (p<0,001), *Ocn* 14× (p<0,005), *Opn* 10,2× (p<0,005), *Colla1* 7,03×, dok je promjena ekspresije uz *Actb* kao referentni gen za *Runx2* iznosila 3,2× (p<0,005), *Osx* 2,5× (p<0,005), *Ocn* 10,3× (p<0,05), *Opn* 7,30× (p<0,005), *Colla1* 4,8× u odnosu na kontrolnu skupinu. Za ovu skupinu ekspresija svih ispitivanih gena je statistički značajno povećana. Od svih tretiranih skupina, promjena ekspresije *Runx2* i *Colla1* najveća je u ovoj skupini i to uz oba referentna gena.

U skupini tretiranoj s BMP-2 u koncentraciji 100 ng/mL promjena ekspresije u odnosu na kontrolu uz *Gapdh* kao referentni gen za *Runx2* iznosila je 2,6× (p<0,01), *Osx* 6,00× (p<0,001), *Ocn* 38× (p<0,000005), *Opn* 13× (p<0,005), *Colla1* 1,9× (p<0,005), dok je promjena ekspresije uz *Actb* kao referentni gen za *Runx2* 1,7 (p<0,05), *Osx* 3,8 (p<0,00005), *Ocn* 24 (p<0,0001), *Opn* 8,18 (p<0,001), *Colla1* 1,23 (p=0,45). Promjena ekspresije je statistički značajno povećana, osim za *Colla1* uz *Actb* kao referentni gen. Od svih tretiranih skupina, promjena ekspresije osterixa i osteopontina najveća je u ovoj skupini uz oba referentna gena.

U skupini tretiranoj s BMP-6 u koncentraciji 50 ng/mL promjena ekspresije u odnosu na kontrolu uz *Gapdh* kao referentni gen za *Runx2* iznosila je 1,5× (p=0,17), *Osx* 2,8× (p<0,005), *Ocn* 7,9× (p<0,0000005), *Opn* 3,29× (p<0,05), *Colla1* 2,28× (p<0,005), dok je promjena ekspresije uz  $\beta$ -aktin kao referentni gen za *Runx2* iznosila 1,5× (p=0,13), *Osx* 2,7× (p<0,005), *Ocn* 7,8× (p<0,00005), *Opn* 3,26× (p<0,05), *Colla1* 2,26× (p<0,05). U skupini tretiranoj s BMP-6 u koncentraciji 100 ng/mL promjena ekspresije u odnosu na kontrolu uz *Gapdh* kao referentni gen je za *Runx2* 1,5× (p=0,12), *Osx* 2,5× (p<0,005), *Ocn* 11× (p<0,00005), *Opn* 3,19× (p<0,05), *Colla1* 3,7× (p<0,01), dok je promjena ekspresije uz  $\beta$ -aktin kao referentni gen za *Runx2* 1,00× (p=0,98), *Osx* 1,7× (p<0,05), *Ocn* 7,29× (p<0,0005), *Opn* 2,13× (p=0,0507), *Colla1* 2,4× (p<0,01). U skupinama tretiranim s BMP-6 u

koncentracijama 50 ng/mL i 100 ng/mL promjena ekspresije je povećana za sve ispitivane gene, ali za *Runx2* ona nije statistički značajna.

U skupini tretiranoj s 1  $\mu$ M fluoksetinom promjena ekspresije u odnosu na kontrolu uz *Gapdh* kao referentni gen za *Runx2* iznosila je 1,6 $\times$  ( $p=0,60$ ), *Osx* 1,11 $\times$  ( $p=0,36$ ), *Ocn* 0,44 $\times$  ( $p<0,005$ ), *Opn* 1,43 $\times$  ( $p=0,24$ ), *Colla1* 0,49 $\times$  ( $p=0,27$ ), dok je promjena ekspresije uz  $\beta$ -aktin kao referentni gen za *Runx2* 1,7 $\times$  ( $p=0,025$ ), *Osx* 1,19 $\times$  ( $p=0,20$ ), *Ocn* 0,47 $\times$  ( $p<0,01$ ), *Opn* 1,5 $\times$  ( $p=0,14$ ), *Colla1* 2,4 $\times$  ( $p=0,33$ ). U ovoj skupini promjena ekspresije je uz oba referentna gena najmanja za sve ispitivane gene osim *Runx2*. Statistički su značajni rezultati za osteokalcin uz oba referentna gena i kolagen 1A1 uz *Gapdh* kao referentni gen, pri čemu je promjena ekspresije u odnosu na kontrolu smanjena. Statistički značajan rezultat je i povećana ekspresija gena *Runx2* uz *Actb* kao referentni gen.

U odnosu na kontrolu promjena ekspresije u skupini tretiranoj BMP-2 u koncentraciji 100 ng/mL i 1  $\mu$ M fluoksetinom uz *Gapdh* kao referentni gen za *Runx2* iznosila je 1,7 $\times$  ( $p=0,067$ ), *Osx* 4,01 $\times$  ( $p<0,00005$ ), *Ocn* 13 $\times$  ( $p<0,00005$ ), *Opn* 2,8 $\times$  ( $p<0,05$ ), *Colla1* 0,96 $\times$  ( $p=0,85$ ), dok je promjena ekspresije uz  $\beta$ -aktin kao referentni gen za *Runx2* 0,94 $\times$  ( $p=0,84$ ), *Osx* 2,25 $\times$  ( $p<0,05$ ), *Ocn* 7,30 $\times$  ( $p<0,005$ ), *Opn* 1,6 $\times$  ( $p=0,34$ ), *Colla1* 0,54 $\times$  ( $p=0,15$ ). Promjena ekspresije je uglavnom manja nego za skupinu tretiranu s BMP-2 u koncentraciji 100 ng/mL bez fluoksetina, ali veća nego za skupinu tretiranu samo s 1  $\mu$ M fluoksetinom.

U odnosu na kontrolu promjena ekspresije u skupini tretiranoj BMP-6 u koncentraciji 100 ng/mL i 1  $\mu$ M fluoksetinom uz *Gapdh* kao referentni gen za *Runx2* iznosila je 1,08 $\times$  ( $p=0,75$ ), *Osx* 1,9 $\times$  ( $p<0,05$ ), *Ocn* 14 $\times$  ( $p<0,00001$ ), *Opn* 0,90 $\times$  ( $p=0,74$ ), *Colla1* 1,3 $\times$  ( $p=0,25$ ), dok je promjena ekspresije uz  $\beta$ -aktin kao referentni gen za *Runx2* iznosila 1,3 $\times$  ( $p=0,25$ ), *Osx* 2,09 $\times$  ( $p<0,05$ ), *Ocn* 18 $\times$  ( $p<0,00001$ ), *Opn* 1,13 $\times$  ( $p=0,69$ ), *Colla1* 1,7 $\times$  ( $p=0,057$ ). Promjena ekspresije je statistički značajno povećana za gene osterix i osteokalcin uz oba referentna gena. Rezultati ne pokazuju jasan obrazac u usporedbi sa skupinom tretiranom s BMP-6 u koncentraciji 100 ng/mL i skupinom tretiranom s 1  $\mu$ M fluoksetinom.

Na Slici 3 su prikazane promjene u ekspresiji osterixa, *Runx2*, osteopontina, osteokalcina i kolagena 1A1 u ispitivanim skupinama uz  $\beta$ -aktin kao referentni gen. Na Slici 4 su prikazane promjene u ekspresiji uz *Gapdh* kao referentni gen.

Tablica 2. Ct vrijednosti dobivene RT-PCR-om. Brojevi (1 i 2) označavaju duplikate napravljene nakon lize stanica, a slova (A i B) duplikate napravljene za RT-PCR. Precrtane vrijednosti su izostavljene iz daljnje računске obrade zbog prevelikog odstupanja od ostalih vrijednosti. (*Actb* -  $\beta$ -aktin, *Osx* – osterix, *Opn* – osteopontin, *Ocn* – osteokalcin, *Colla1* – Kolagen 1A1)

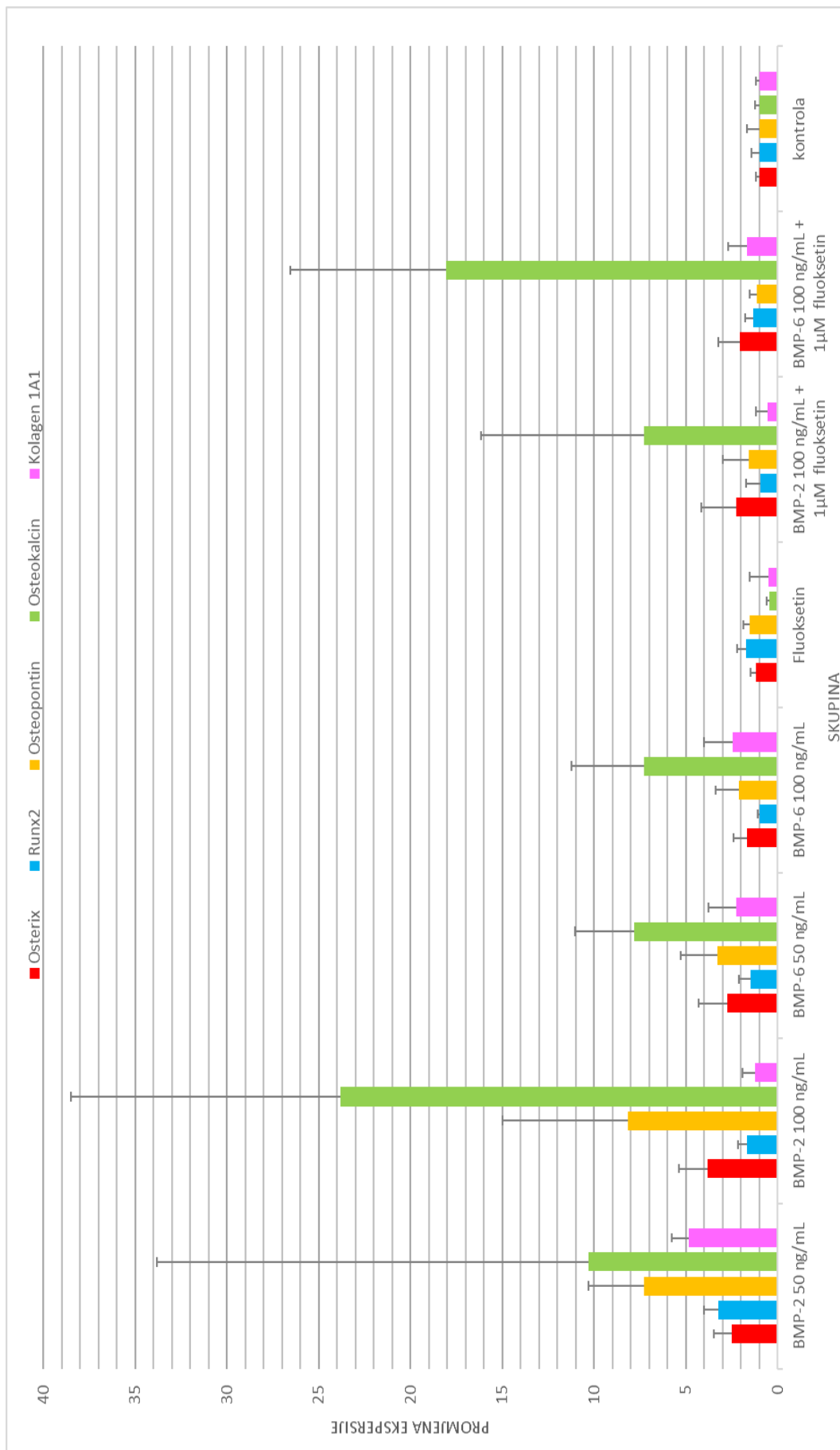
| uzorak  |    | Ct( <i>Actb</i> ) | Ct( <i>Gapdh</i> ) | Ct( <i>Osx</i> ) | Ct( <i>Runx2</i> ) | Ct( <i>Opn</i> ) | Ct( <i>Ocn</i> ) | Ct( <i>Colla1</i> ) |
|---|----|-------------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|---------------------|
| BMP-2<br>50 ng/mL                               | 1A | 19,07             | 17,15              | 23,72            | 24,44              | 43,78            | 35,92            | 22,99               |
|   | 1B | 19,02             | 17,67              | 23,21            | 24,52              | 26,67            | 25,94            | -                   |
|   | 2A | 18,94             | 16,85              | 22,76            | 24,52              | 27,33            | 22,84            | -                   |
|   | 2B | 19,50             | 17,01              | 23,15            | 24,11              | 27,49            | 23,19            | -                   |
| BMP-2<br>100 ng/mL                              | 1A | 19,14             | 17,29              | 22,97            | 25,34              | 27,46            | 23,51            | 24,71               |
|   | 1B | 19,12             | 17,99              | 22,25            | 25,41              | 26,01            | 23,14            | 26,05               |
|   | 2A | 19,69             | 17,27              | 23,08            | 25,69              | 27,88            | 22,08            | 25,11               |
|   | 2B | 19,53             | 17,72              | 23,11            | 25,85              | 27,51            | 23,25            | 25,20               |
| BMP-6<br>50 ng/mL                               | 1A | 18,94             | 16,57              | 23,61            | 25,94              | 28,84            | 24,22            | 23,74               |
|   | 1B | 19,94             | 16,79              | 23,64            | 25,77              | 28,16            | 24,61            | 23,82               |
|   | 2A | 19,06             | 16,89              | 22,75            | 25,56              | 28,86            | 24,53            | 24,94               |
|   | 2B | 19,07             | 16,98              | 22,87            | 25,30              | 27,83            | 24,58            | 24,58               |
| BMP-6<br>100 ng/mL                              | 1A | 18,66             | 16,85              | 23,11            | 25,89              | 27,69            | 23,40            | 23,72               |
|   | 1B | 18,98             | 16,91              | 24,21            | 25,70              | 28,70            | 24,22            | 24,52               |
|   | 2A | 18,92             | 16,82              | 23,16            | 25,84              | 29,10            | 24,24            | 23,95               |
|   | 2B | 18,85             | 17,34              | 23,64            | 25,80              | 29,07            | 24,89            | 22,84               |
| Fluoksetin<br>1 $\mu$ M                         | 1A | 19,18             | 16,58              | 24,29            | 25,26              | 29,45            | 29,02            | 26,71               |
|   | 1B | 19,71             | 16,95              | 24,51            | 25,43              | 29,71            | 28,87            | 24,95               |
|   | 2A | 19,49             | 17,09              | 24,72            | 25,89              | 29,72            | 28,70            | 25,91               |
|   | 2B | 19,24             | 16,78              | 24,76            | 25,68              | 29,78            | 28,24            | 28,60               |
| BMP-2<br>100 ng/mL +<br>fluoksetin<br>1 $\mu$ M | 1A | 17,93             | 16,61              | 22,59            | 25,47              | 28,71            | 23,20            | 25,83               |
|   | 1B | 18,25             | 16,61              | 22,74            | 25,62              | 29,14            | 23,88            | 24,60               |
|   | 2A | 19,85             | 17,30              | 22,86            | 25,84              | 28,44            | 23,70            | 25,88               |
|   | 2B | 18,44             | 17,45              | 23,24            | 25,69              | 29,00            | 25,02            | 26,51               |
| BMP-6<br>100 ng/mL +<br>fluoksetin<br>1 $\mu$ M | 1A | 18,86             | 16,32              | 23,98            | 25,72              | 29,56            | 23,54            | 24,92               |
|   | 1B | 19,06             | 16,37              | 23,10            | 25,90              | 29,56            | 22,90            | 24,79               |
|   | 2A | 19,47             | 16,23              | 40,44            | 25,21              | 29,76            | 23,46            | 24,77               |
|   | 2B | 18,93             | 16,27              | 22,82            | 25,57              | 30,23            | 22,52            | 23,60               |
| Kontrola  | 1A | 18,56             | 16,25              | 23,89            | 25,19              | 29,04            | 27,17            | 24,75               |
|   | 1B | 18,69             | 16,36              | 24,16            | 25,25              | 29,46            | 27,14            | 24,86               |
|   | 2A | 18,77             | 16,16              | 24,00            | 26,11              | 29,13            | 26,52            | 25,26               |
|   | 2B | 18,74             | 16,16              | 24,36            | 26,01              | 30,64            | 26,73            | 24,67               |

Tablica 3. P-vrijednosti dobivene Studentovim t-testom usporedbom normaliziranih vrijednosti tretiranih skupina i normaliziranih vrijednosti kontrolne skupine uz  $\beta$ -aktin kao referenti gen. Crvenom bojom su označene vrijednosti manje od 0,05. (*Osx* – osterix, *Opn* – osteopontin, *Ocn* – osteokalcin, *Colla1* – kolagen tip 1A1)

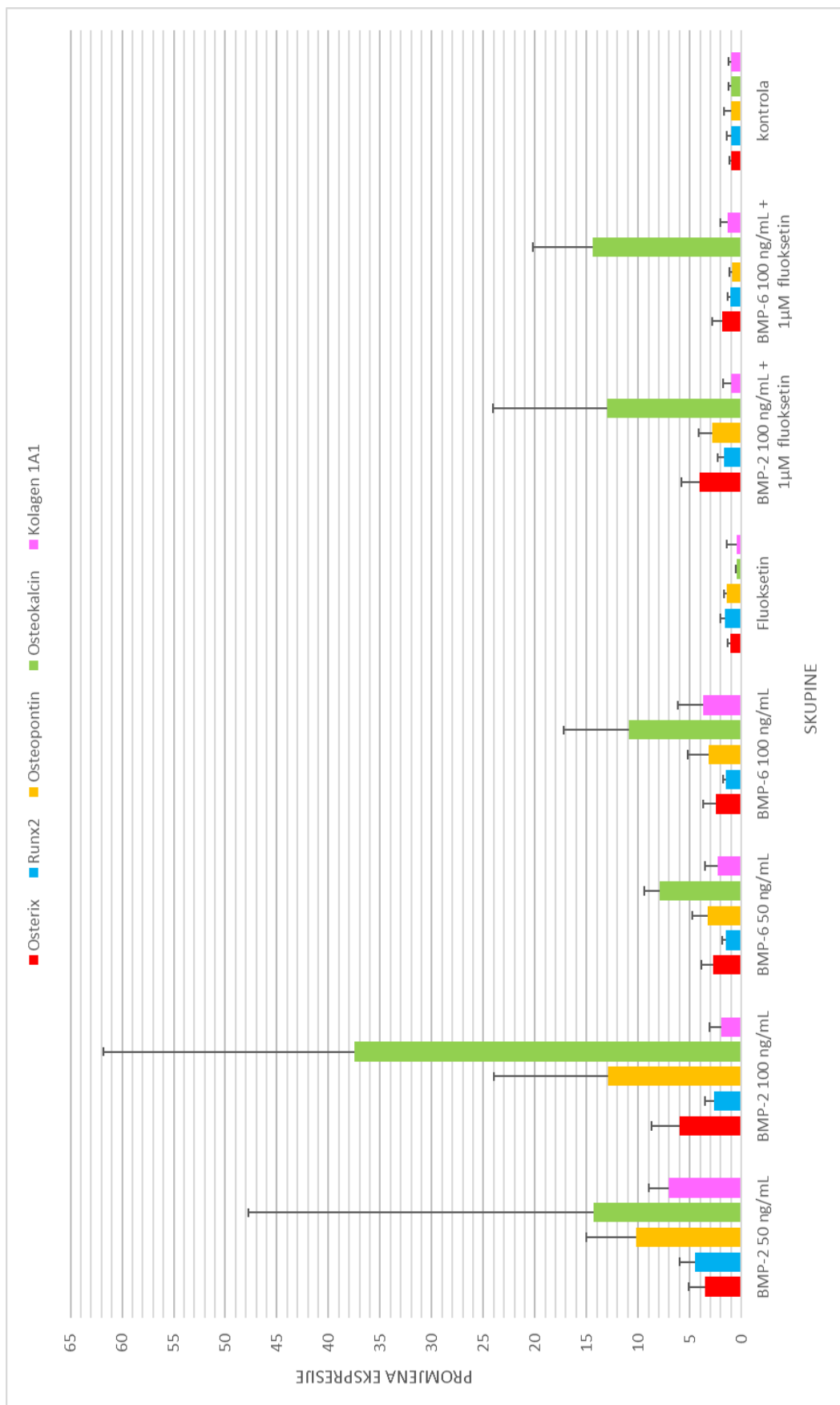
|   | <i>Osx</i>           | <i>Runx2</i>        | <i>Opn</i>          | <i>Ocn</i>           | <i>Colla1</i>       |
|---|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| BMP-2 50 ng/mL                            | $1,3 \cdot 10^{-3}$  | $1,4 \cdot 10^{-3}$ | $1,4 \cdot 10^{-3}$ | 0,014                | /                   |
| BMP-2 100 ng/mL                           | $2,9 \cdot 10^{-5}$  | 0,014               | $7,3 \cdot 10^{-4}$ | $7,29 \cdot 10^{-5}$ | 0,45                |
| BMP-6 50 ng/mL                            | $1,19 \cdot 10^{-3}$ | 0,13                | 0,019               | $4,01 \cdot 10^{-5}$ | 0,0414              |
| BMP-6 100 ng/mL                           | 0,019                | 0,98                | 0,0507              | $1,4 \cdot 10^{-4}$  | $9,8 \cdot 10^{-3}$ |
| Fluoksetin 1 $\mu$ M                      | 0,20                 | 0,025               | 0,14                | $6,7 \cdot 10^{-3}$  | 0,33                |
| BMP-2 100 ng/mL +<br>Fluoksetin 1 $\mu$ M | 0,0325               | 0,84                | 0,34                | $3,07 \cdot 10^{-3}$ | 0,15                |
| BMP-6 100 ng/mL +<br>Fluoksetin 1 $\mu$ M | 0,026                | 0,25                | 0,69                | $9,8 \cdot 10^{-6}$  | 0,057               |

Tablica 4. P-vrijednosti dobivene Studentovim t-testom usporedbom normaliziranih vrijednosti tretiranih skupina i normaliziranih vrijednosti kontrolne skupine uz GAPDH kao referenti gen. Crvenom bojom su obilježene vrijednosti manje od 0,05. (*Osx* – osterix, *Opn* – osteopontin, *Ocn* – osteokalcin, *Colla1* – kolagen tip 1A1)

|   | <i>Osx</i>           | <i>Runx2</i>         | <i>Opn</i>          | <i>Ocn</i>           | <i>Colla1</i>        |
|---|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| BMP-2 50 ng/mL                            | $3,03 \cdot 10^{-4}$ | $6,13 \cdot 10^{-4}$ | $2,9 \cdot 10^{-3}$ | $1,7 \cdot 10^{-3}$  | /                    |
| BMP-2 100 ng/mL                           | $4,4 \cdot 10^{-4}$  | $7,5 \cdot 10^{-3}$  | $1,7 \cdot 10^{-3}$ | $3,7 \cdot 10^{-6}$  | $4,20 \cdot 10^{-3}$ |
| BMP-6 50 ng/mL                            | $4,6 \cdot 10^{-3}$  | 0,17                 | 0,014               | $4,9 \cdot 10^{-7}$  | $4,9 \cdot 10^{-3}$  |
| BMP-6 100 ng/mL                           | $3,11 \cdot 10^{-3}$ | 0,12                 | 0,014               | $1,03 \cdot 10^{-5}$ | $7,7 \cdot 10^{-3}$  |
| Fluoksetin 1 $\mu$ M                      | 0,36                 | 0,060                | 0,24                | $2,9 \cdot 10^{-3}$  | 0,27                 |
| BMP-2 100 ng/mL +<br>Fluoksetin 1 $\mu$ M | $2,30 \cdot 10^{-5}$ | 0,067                | 0,0224              | $1,8 \cdot 10^{-5}$  | 0,85                 |
| BMP-6 100 ng/mL +<br>Fluoksetin 1 $\mu$ M | 0,039                | 0,75                 | 0,74                | $8,5 \cdot 10^{-6}$  | 0,25                 |



Slika 3. Grafički prikaz promjene ekspresije (engl. *fold change*) osterixa, runx2, osteopontina, osteokalцина i kolagena 1A1 u ispitivanim skupinama uz  $\beta$ -aktin kao referenti gen. Crtama iznad stupaca je prikazana gornja granica moguće pogreške rezultata (engl. *upper limit*).



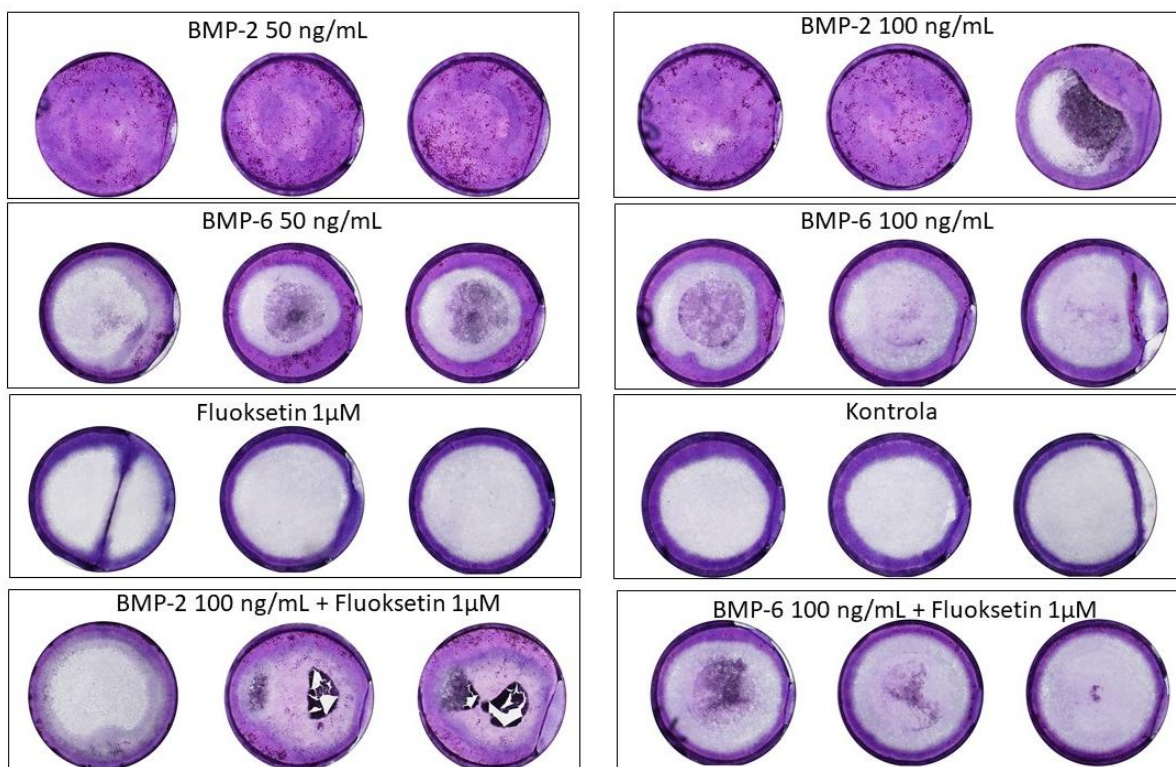
Slika 4. Grafički prikaz promjene ekspresije (engl. *fold change*) osterixa, runx2, osteopontina, osteokalcina i kolagena 1A1 u ispitivanim skupinama uz *Gapdh* kao referenti gen. Crtama iznad stupaca je prikazana gornja granica moguće pogreške rezultata (engl. *upper limit*).



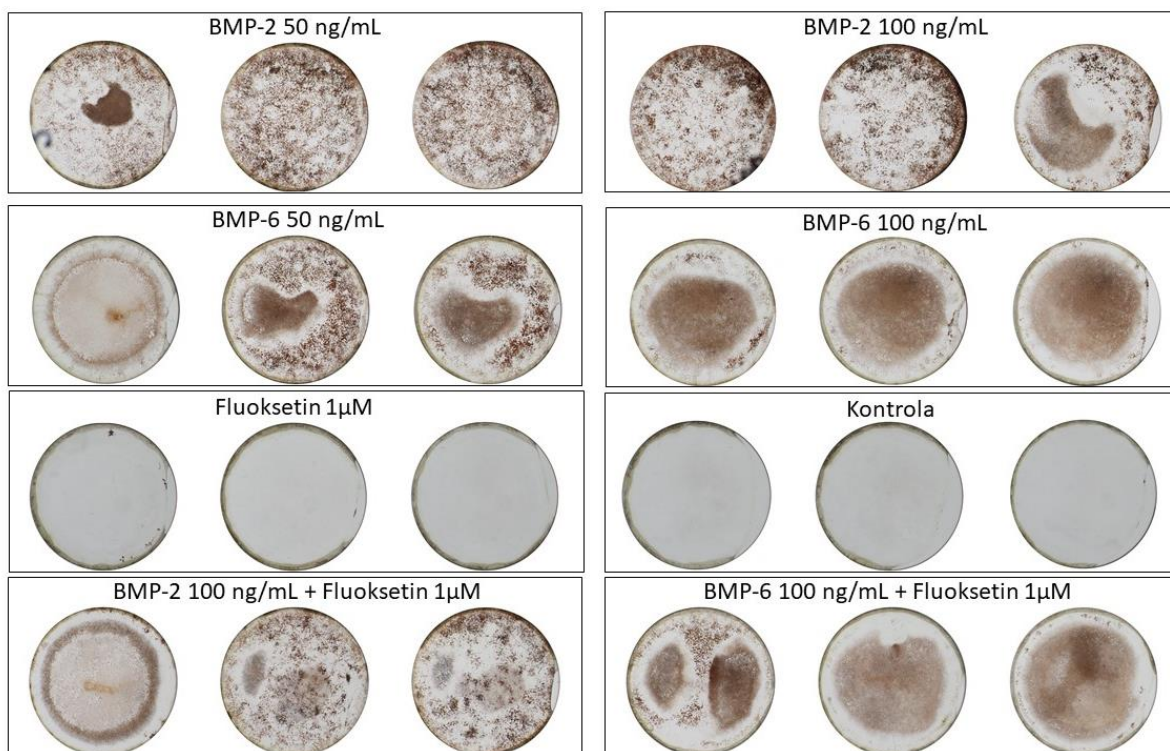
Obrađene i uređene fotografije dna jažica ploče bojane na alkalnu fosfatazu su prikazane na Slici 5. Tablica 5 prikazuje prosječne intenzitete piksela na pojedinoj slici dobivene računalnom analizom.

Tablica 6 prikazuje relativne razlike prosjeka intenziteta piksela na ploči bojanoj na ALP i po von Kossi između tretiranih skupina i kontrole te pripadajuće p-vrijednosti dobivene Studentovim t-testom. U tablici 6 prikazane su i relativne razlike prosjeka udjela crvene boje na ploči bojanoj na ALP, normaliziranih prema kontroli za sve tretirane skupine te pripadajuće p-vrijednosti dobivene Studentovim t-testom.

Na ploči bojanoj na alkalnu fosfatazu manji prosječan intenzitet piksela znači da je veća površina slike tamna, odnosno obojana ili da je intenzivnije obojana što ukazuje na prisutnost većeg broja stanica, dok povećan udio crvene boje ukazuje na povećanu aktivnost alkalne fosfataze. Na ploči bojanoj po von Kossi manji prosječan intenzitet piksela također znači da je veća površina slike tamna, odnosno obojana ili da je intenzivnije obojana što ukazuje na veću količinu kalcija, odnosno reflektira mineralizaciju matriksa u jažici. U usporedbi s kontrolom, sve ispitivane skupine imaju smanjeni prosječan intenzitet piksela na obje ploče i povećani udio crvene boje na ploči bojanoj na ALP, osim skupine tretirane samo s fluoksetinom, u kojoj su rezultati suprotni: prosječan intenzitet piksela je povećan, dok je udio crvene boje smanjen. Za prosječan intenzitet piksela na ploči bojanoj na ALP, smanjenje u odnosu na kontrolu je značajno samo za skupine tretirane samo s BMP-2. Za prosječan intenzitet piksela statistički značajnom razlikom u odnosu na kontrolnu skupinu mogu se smatrati promjene u svim skupinama osim one tretirane samo fluoksetinom.



Slika 5. Fotografije dna jažica na ploči za uzgoj stanica obojane na alkalnu fosfatazu.



Slika 6. Fotografije dna jažica na ploči za uzgoj stanica obojane po von Kossa metodi.

Tablica 5. Prikaz računalno dobivenih prosječnih vrijednosti intenziteta piksela fotografija dna jažica. Brojevi redom označavaju jažice sa Slika 4 i 5 s lijeva na desno. (von Kossa – vrijednosti s pločice obojane po von Kossa metodi, ALP – vrijednosti s pločice obojane na alkalnu fosfatazu, RGB – vrijednosti intenziteta piksela po boji, R – crvena (engl. *red*), G – zelena (engl. *green*), B – plava (engl. *blue*))

|  |   | von Kossa | ALP     | ALP     |        |         |
|--|---|-----------|---------|---------|--------|---------|
|  |   |           |         | R       | G      | B       |
| BMP-2<br>100 ng/mL +<br>fluoksetin 1 $\mu$ M | 1 | 171,745   | 160,176 | 96,747  | 56,671 | 131,094 |
|  | 2 | 165,179   | 147,752 | 111,946 | 60,397 | 147,081 |
|  | 3 | 165,950   | 146,523 | 113,962 | 64,255 | 145,646 |
| BMP-6<br>100 ng/mL +<br>fluoksetin 1 $\mu$ M | 1 | 160,789   | 148,122 | 93,163  | 49,392 | 131,610 |
|  | 2 | 165,189   | 150,511 | 90,273  | 44,745 | 128,057 |
|  | 3 | 156,468   | 155,888 | 81,617  | 39,311 | 114,486 |
| BMP-2 50 ng/mL                               | 1 | 172,229   | 141,915 | 149,570 | 74,357 | 186,475 |
|  | 2 | 161,265   | 134,612 | 138,968 | 65,691 | 174,434 |
|  | 3 | 160,744   | 139,227 | 144,067 | 68,494 | 176,656 |
| BMP-6 50 ng/mL                               | 1 | 173,380   | 154,913 | 83,474  | 42,161 | 117,588 |
|  | 2 | 155,199   | 146,198 | 118,261 | 54,527 | 154,407 |
|  | 3 | 158,658   | 146,508 | 117,780 | 56,002 | 155,694 |
| BMP-2<br>100 ng/mL                           | 1 | 163,751   | 137,724 | 139,309 | 69,801 | 175,484 |
|  | 2 | 163,611   | 143,442 | 146,139 | 74,847 | 181,811 |
|  | 3 | 168,086   | 148,170 | 126,841 | 73,850 | 165,270 |
| BMP-6<br>100 ng/mL                           | 1 | 158,620   | 152,167 | 117,765 | 59,315 | 155,209 |
|  | 2 | 157,988   | 158,383 | 107,163 | 54,347 | 144,431 |
|  | 3 | 160,180   | 161,537 | 102,397 | 53,637 | 142,113 |
| Kontrola                                     | 1 | 177,234   | 154,645 | 84,155  | 41,851 | 133,556 |
|  | 2 | 176,130   | 161,288 | 95,122  | 52,307 | 147,096 |
|  | 3 | 179,542   | 161,733 | 71,679  | 40,764 | 117,208 |
| Fluoksetin 1 $\mu$ M                         | 1 | 175,579   | 157,956 | 74,785  | 44,188 | 126,666 |
|  | 2 | 181,375   | 160,990 | 77,454  | 42,116 | 126,216 |
|  | 3 | 177,471   | 159,358 | 74,720  | 37,947 | 122,130 |

Tablica 6. Relativna razlika prosjeka intenziteta piksela na ploči bojanjoj na ALP i po von Kossi između tretiranih skupina i kontrole te pripadajuće p-vrijednosti dobivene Studentovim t-testom. Relativna razlika prosjeka udjela crvene boje na ploči bojanjoj na ALP, normaliziranih prema kontroli za sve tretirane skupine te pripadajuće p-vrijednosti dobivene Studentovim t-testom. Crvenom bojom su označene p-vrijednosti manje od 0,05.

|  | Relativna razlika prosjeka intenziteta piksela za ploču bojanu po von Kossi (lijevi stupac) i pripadajuća p-vrijednost (desni stupac) |                      | Relativna razlika prosjeka intenziteta piksela za ploču bojanu na ALP (lijevi stupac) i pripadajuća p-vrijednost (desni stupac) |                     | Relativna razlika prosjeka udjela crvene boje za ploču bojanu na ALP (lijevi stupac) i pripadajuća p-vrijednost (desni stupac) |                      |
|--|---|----------------------|---|---------------------|--|----------------------|
|  |   |                      |   |                     |  |                      |
| BMP-2 100 ng/mL + fluoksetin 1 $\mu$ M | -5,64   | 0,0122               | -4,86   | 0,19                | 8,66   | $6,6 \cdot 10^{-3}$  |
| BMP-6 100 ng/mL + fluoksetin 1 $\mu$ M | -9,47   | $3,4 \cdot 10^{-3}$  | -4,85   | 0,076               | 7,33   | $5,6 \cdot 10^{-3}$  |
| BMP-2 50 ng/mL                         | -7,26   | 0,029                | -12,96  | $2,7 \cdot 10^{-3}$ | 14,79  | $3,5 \cdot 10^{-4}$  |
| BMP-6 50 ng/mL                         | -8,57   | 0,055                | -6,29   | 0,0521              | 10,72  | $7,06 \cdot 10^{-3}$ |
| BMP-2 100 ng/mL                        | -7,03   | $2,17 \cdot 10^{-3}$ | -10,12  | 0,013               | 11,71  | $4,6 \cdot 10^{-3}$  |
| BMP-6 100 ng/mL                        | -10,53  | $9,8 \cdot 10^{-5}$  | -1,17   | 0,63                | 9,26   | $4,07 \cdot 10^{-3}$ |
| Fluoksetin 1 $\mu$ M                   | 0,29  | 0,81                 | 0,13  | 0,94                | -2,24  | 0,28                 |

U Tablici 7 su prikazani omjeri rezultata (promjena ekspresije za RT-PCR i relativna razlika u odnosu na kontrolu za bojanja) za skupine tretirane s BMP-2 u koncentraciji 100 ng/mL bez 1  $\mu$ M fluoksetina i s njim, te pripadajuće p-vrijednosti dobivene Studentovim t-testom, također prikazani su i omjeri rezultata za skupine tretirane s BMP-6 u koncentraciji 100 ng/mL bez 1  $\mu$ M fluoksetina i s njim, te pripadajuće p-vrijednosti. BMP-2 bez fluoksetina izaziva 1,26-5,11 puta veći efekt od kombinacije BMP-2 i fluoksetina. P-vrijednosti uglavnom nisu manje od 0,05, osim za osteopontin. BMP-6 bez fluoksetina izaziva veću ekspresiju osteopontina i kolagena 1A1, veću aktivnost ALP-a i intenzivniju mineralizaciju, dok BMP-6 s fluoksetinom izaziva veću ekspresiju osteokalcina i intenzivniju proliferaciju. Ekspresija *Runx2* i *osterixa* je veća u različitim skupinama ovisno o referentnom genu. Uz  $\beta$ -aktin kao referentni gen veća ekspresija opažena je u skupini tretiranoj s BMP-6 i fluoksetinom, dok je uz *Gapdh* kao referentni gen ekspresija veća u skupini tretiranoj s BMP-6 bez fluoksetina.

Tablica 7. Omjer rezultata za skupine tretirane s BMP u koncentraciji 100 ng/mL bez 1 $\mu$ M fluoksetina i s njim, te pripadajuće p-vrijednosti dobivene Studentovim t-testom. Crvenom bojom su označene p-vrijednosti manje od 0,05. (Rezultat za RT-PCR je promjena ekspresije, a za bojanja relativna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu.)

|   | Referentni gen | Omjer rezultata za skupinu tretiranu s BMP-2 bez fluoksetina i s njim (lijevi stupac) te pripadajuća p-vrijednost (desni stupac) |                      | Omjer rezultata za skupinu tretiranu s BMP-6 bez fluoksetina i s njim (lijevi stupac) te pripadajuća p-vrijednost (desni stupac) |                      |
|---|----------------|--|----------------------|--|----------------------|
|   |                |  |                      |  |                      |
| Osterix   | <i>Actb</i>    | 1,69   | 0,14                 | 0,81   | 0,46                 |
|   | <i>Gapdh</i>   | 1,50   | 0,17                 | 1,32   | 0,35                 |
| RUNX2   | <i>Actb</i>    | 1,81   | 0,0603               | 0,77   | 0,18                 |
|   | <i>Gapdh</i>   | 1,53   | 0,0518               | 1,39   | 0,038                |
| Osteopontin   | <i>Actb</i>    | 5,11   | 9,8·10 <sup>-3</sup> | 1,88   | 0,0415               |
|   | <i>Gapdh</i>   | 4,64   | 0,015                | 3,54   | 2,0·10 <sup>-3</sup> |
| Osteokalcin   | <i>Actb</i>    | 3,29   | 0,054                | 0,41   | 0,0102               |
|   | <i>Gapdh</i>   | 2,92   | 9,7·10 <sup>-3</sup> | 0,85   | 0,28                 |
| Kolagen 1A1   | <i>Actb</i>    | 2,28   | 0,107                | 4,44   | 0,27                 |
|   | <i>Gapdh</i>   | 1,98   | 0,018                | 2,85   | 0,037                |
| Prosječan intenzitet piksela na ploči bojanj na alkalnu fosfatazu |                | 2,06   | 0,19                 | 0,24   | 0,18                 |
| Prosječan udio crvene boje na ploči bojanj na alkalnu fosfatazu   |                | 1,38   | 0,208                | 1,27   | 0,18                 |
| Prosječan intenzitet piksela na ploči bojanj po von Kossa metodi  |                | 1,26   | 0,39                 | 1,16   | 0,509                |

U Tablici 8 su prikazani omjeri rezultata (promjena ekspresije za RT-PCR i relativna razlika u odnosu na kontrolu za bojanja) za skupine tretirane s BMP-2 u koncentraciji 50 ng/mL i 100 ng/mL, te pripadajuće p-vrijednosti dobivene Studentovim t-testom, također prikazani su i omjeri rezultata za skupine tretirane s BMP-6 u koncentraciji 50 ng/mL i 100 ng/mL, te pripadajuće p-vrijednosti. BMP-2 u koncentraciji 50 ng/mL je izazvao veću ekspresiju osterixa, osteopontina i osteokalcina, a BMP-2 u koncentraciji 100 ng/mL je izazvao veću ekspresiju *Runx2* i kolagena 1A1, te veću aktivnost ALP-a, intenzivniju proliferaciju i mineralizaciju. Međutim, samo za *Runx2* razlika između dvije skupine je statistički značajna ( $p < 0,05$ ). BMP-6 je izazvao veću ekspresiju osterixa, *Runx2*, osteopontina, intenzivniju proliferaciju i veću aktivnost ALP-a. Kombinacija BMP-6 i fluoksetina je izazvala veću ekspresiju kolagena 1A1 i intenzivniju mineralizaciju. P-vrijednost nije manja od 0,05 ni za jedan parametar između ove dvije skupine.

Tablica 9 prikazuje omjere rezultata (promjena ekspresije za RT-PCR i relativna razlika u odnosu na kontrolu za bojanja) za skupine tretirane s: BMP-2 i -6 u koncentraciji 50 ng/mL, BMP-2 i -6 u koncentraciji 100 ng/mL, BMP-2 i -6 u koncentraciji 100 ng/mL i 1  $\mu$ M fluoksetinom, te pripadajuće p-vrijednosti dobivene Studentovim t-testom. Usporedbom skupina tretiranih s BMP-ovima u koncentraciji 50 ng/mL uočava se veća ekspresija *Runx2*, osteopontina, osteokalcina i kolagena 1A1, te intenzivnija proliferacija i veća aktivnost ALP-a, uz varijabilne p-vrijednosti, pri čemu su one za *Runx2* najvećeg statističkog značaja. BMP-6 u koncentraciji 50 ng/mL je pokazao veći utjecaj samo na mineralizaciju, ali bez statističkog značaja. Usporedbom skupina tretiranih s BMP-ovima u koncentraciji 100 ng/mL opaža se sličan trend. BMP-2 je izazvao 1,7-4,08 puta veću ekspresiju osterixa, *Runx2*, osteopontina i osteokalcina, te jaču proliferaciju i veću aktivnost ALP-a. Razlike za navedene parametre, osim aktivnosti ALP-a, su statistički značajne ( $p < 0,05$ ). BMP-6 je izazvao veću ekspresiju kolagena 1A1 i statistički značajno pojačanu mineralizaciju ( $p < 0,05$ ). U kombinaciji s fluoksetinom, ne opaža se dominantno veći učinak BMP-2 kao u preostalim skupinama. Kombinacija BMP-2 i fluoksetina je izazvala veću ekspresiju osterixa i osteopontina, te intenzivniju mineralizaciju, ali je BMP-6 u kombinaciji s fluoksetinom uzrokovao veću ekspresiju osteokalcina i kolagena 1A1, ponešto veću aktivnost ALP-a i intenzivniju mineralizaciju.

Tablica 8. Omjer rezultata za skupine tretirane s BMP u koncentraciji 50 ng/mL i 100 ng/mL, te pripadajuće p-vrijednosti dobivene Studentovim t-testom. Crvenom bojom su označene p-vrijednosti manje od 0,05. (Rezultat za RT-PCR je promjena ekspresije, a za bojanja relativna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu.)

|   | Referentni gen | Omjer rezultata za skupinu tretiranu s BMP-2 u koncentraciji 50 ng/mL i 100 ng/mL (lijevi stupac) te pripadajuća p-vrijednost (desni stupac) |                      | Omjer rezultata za skupinu tretiranu s BMP-6 u koncentraciji 50 ng/mL i 100 ng/mL (lijevi stupac) te pripadajuća p-vrijednost (desni stupac) |       |
|---|----------------|--|----------------------|--|-------|
|   |                |  |                      |  |       |
| Osterix   | <i>Actb</i>    | 0,66   | 0,35                 | 1,59   | 0,068 |
|   | <i>Gapdh</i>   | 0,60   | 0,48                 | 1,12   | 0,74  |
| RUNX2   | <i>Actb</i>    | 1,88   | $5,14 \cdot 10^{-3}$ | 1,50   | 0,079 |
|   | <i>Gapdh</i>   | 1,73   | 0,0313               | 1,00   | 0,98  |
| Osteopontin   | <i>Actb</i>    | 0,89   | 0,723                | 1,53   | 0,26  |
|   | <i>Gapdh</i>   | 0,78   | 0,86                 | 1,03   | 0,92  |
| Osteokalcin   | <i>Actb</i>    | 0,43   | 0,407                | 1,07   | 0,77  |
|   | <i>Gapdh</i>   | 0,37   | 0,314                | 0,72   | 0,087 |
| Kolagen 1A1   | <i>Actb</i>    | 3,90   | /                    | 0,98   | 0,84  |
|   | <i>Gapdh</i>   | 3,70   | /                    | 0,62   | 0,226 |
| Prosječan intenzitet piksela na ploči bojanjoj na alkalnu fosfatazu |                | 1,25   | 0,29                 | 1,19   | 0,109 |
| Prosječan udio crvene boje na ploči bojanjoj na alkalnu fosfatazu   |                | 1,29   | 0,15                 | 5,38   | 0,506 |
| Prosječan intenzitet piksela na ploči bojanjoj po von Kossa metodi  |                | 1,03   | 0,925                | 0,78   | 0,57  |

Tablica 9. Omjer rezultata za skupine tretirane s: BMP-2 i -6 u koncentraciji 50 ng/mL, BMP-2 i -6 u koncentraciji 100 ng/mL, BMP-2 i -6 u koncentraciji 100 ng/mL i 1  $\mu$ M fluoksetinom, te pripadajuće p-vrijednosti dobivene Studentovim t-testom. Crvenom bojom su označene p-vrijednosti manje od 0,05. (Rezultat za RT-PCR je promjena ekspresije, a za bojanja relativna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu.)

|   | Referenti gen | Omjer rezultata za skupinu tretiranu s BMP-2 i BMP-6 u koncentraciji 50 ng/mL (lijevi stupac) te pripadajuća p-vrijednost (desni stupac) |                      | Omjer rezultata za skupinu tretiranu s BMP-2 i BMP-6 u koncentraciji 100 ng/mL (lijevi stupac) te pripadajuća p-vrijednost (desni stupac) |                      | Omjer rezultata za skupinu tretiranu s 100 ng/mL BMP-2 i BMP-6 i 1 $\mu$ M fluoksetinom (lijevi stupac) te pripadajuća p-vrijednost (desni stupac) |        |
|---|---------------|--|----------------------|---|----------------------|--|--------|
|   |               |  |                      |   |                      |  |        |
| Osterix   | <i>Actb</i>   | 0,93   | 0,74                 | 2,24  | $3,9 \cdot 10^{-3}$  | 1,08   | 0,86   |
|   | <i>Gapdh</i>  | 1,29   | 0,37                 | 2,40  | 0,027                | 2,11   | 0,018  |
| RUNX2   | <i>Actb</i>   | 2,13   | 0,015                | 1,70  | $1,04 \cdot 10^{-3}$ | 0,72   | 0,29   |
|   | <i>Gapdh</i>  | 3,00   | $1,27 \cdot 10^{-3}$ | 1,73  | 0,017                | 1,57   | 0,0217 |
| Osteopontin   | <i>Actb</i>   | 2,24   | 0,074                | 3,84  | $3,9 \cdot 10^{-3}$  | 1,42   | 0,43   |
|   | <i>Gapdh</i>  | 3,10   | 0,0329               | 4,08  | 0,0202               | 3,11   | 0,0034 |
| Osteokalcin   | <i>Actb</i>   | 1,32   | 0,68                 | 3,29  | 0,015                | 0,41   | 0,077  |
|   | <i>Gapdh</i>  | 1,77   | 0,218                | 3,45  | $3,24 \cdot 10^{-3}$ | 0,93   | 0,700  |
| Kolagen 1A1   | <i>Actb</i>   | 2,03   | /                    | 0,51  | 0,0828               | 0,32   | 0,034  |
|   | <i>Gapdh</i>  | 3,08   | /                    | 0,51  | 0,101                | 0,74   | 0,27   |
| Prosječan intenzitet piksela na ploči bojanjoj na alkalnu fosfatazu |               | 1,36   | 0,0407               | 1,30  | 0,025                | 1,19   | 1,00   |
| Prosječan udio crvene boje na ploči bojanjoj na alkalnu fosfatazu   |               | 2,07   | 0,088                | 8,63  | 0,27                 | 0,96   | 0,37   |
| Prosječan intenzitet piksela na ploči bojanjoj po von Kossa metodi  |               | 0,84   | 0,75                 | 0,64  | 0,018                | 0,59   | 0,105  |



## Rasprava

Dodatak BMP-2 u diferencijacijski medij je pokazao izuzetno pozitivan učinak na proliferaciju i diferencijaciju stanica što se očitovalo višestrukim povećanjem ekspresije diferencijacijskih biljega *Runx2*, *osterixa*, *osteopontina*, *osteokalcina* i *kolagena* uz statistički značajne p-vrijednosti. Obradom fotografija pokazana je i pojačana proliferacija, ekspresija alkalne fosfataze i mineralizacija, također uz statistički značajne p-vrijednosti. Ovi rezultati su u skladu s već poznatim svojstvima BMP-2 iz literature (Halloran i sur., 2020; Salazar i sur., 2016; Wu i sur., 2016; Carreira i sur., 2014).

Usporedbom rezultata dobivenih za skupine u kojima je BMP-2 dodan u koncentraciji 50 ng/mL i 100 ng/mL nisu zabilježene značajnije promjene, izuzev usporedbom ekspresije *Runx2* za kojeg je promjena ekspresije veća u skupini tretiranoj s 50 ng/mL i to 1,9 ( $p < 0,01$ ) i 1,7 ( $p < 0,05$ ) puta uz, redom, *Actb* i *Gapdh* kao referentni gen. Ekspresija *Runx2* je manja u skupini tretiranoj sa 100 ng/mL BMP-2 što bi moglo ukazivati da su stanice u toj skupini došle do daljeg diferencijacijskog stadija u kojem se ekspresija ranog biljega diferencijacije *Runx2* smanjuje. Poznato je da je *Runx2* nužan za diferencijaciju osteoblasta, ali u kasnijim stadijima je strogo reguliran (Schroeder i sur., 2005).

BMP-6 je također pokazao pozitivan učinak na diferencijaciju stanica, iako u znatno manjoj mjeri nego BMP-2. Snažniji učinak BMP-2 u odnosu na BMP-6 izraženiji je između skupina tretiranih sa 100 ng/mL BMP-a, tj. omjeri njihovih rezultata su veći, a p-vrijednosti manje. Od svih ispitivanih svojstava BMP-6 se pokazao boljim stimulatorom diferencijacije jedino kroz značajno intenzivniju mineralizaciju u skupinama tretiranim s BMP-om u koncentraciji 100 ng/mL. S obzirom na ostale rezultate, prema kojima je ekspresija diferencijacijskih biljega manja u skupinama tretiranim s BMP-6, ovom neočekivanom rezultatu treba pristupiti s rezervom i kritički ga razmotriti. Moguć uzrok pogreške (ako je do nje došlo) je u gruboj makroskopskoj procjeni učinka. Mikroskopsko brojanje koštanih čvorića bi bila točnija metoda. Ipak, iako statistički nisu značajni rezultati, BMP-6 je potaknuo jaču mineralizaciju i u skupinama tretiranim s 50 ng/mL i u kombinaciji s fluoksetinom, u usporedbi s ekvivalentnim skupinama tretiranim s BMP-2. Dakle, kroz sve skupine tretirane BMP-ovima uočljiv je trend pojačane mineralizacije u skupinama tretiranim s BMP-6 u usporedbi sa skupinama tretiranim s BMP-2, što nije opažanje koje ide u prilog mogućnosti pogreške.

BMP-6 u koncentraciji 50 ng/mL na ploči bojanoj po von Kossa metodi nije pokazao statistički značajan efekt prema tradicionalnom pragu za p-vrijednost od 0,05, međutim, na

ploči se uočava popriličan "efekt ruba" (engl. *edge effect*), tj. razlika u rastu stanica u rubnim jažicama ploče u usporedbi sa središnjim jažicama. Ako se izuzme rubna jažica, p-vrijednost iznosi  $1,5 \cdot 10^{-3}$ . Efekt ruba bi se u budućim eksperimentima mogao umanjiti inkubiranjem stanica na sobnoj temperaturi jedan sat nakon nasađivanja umjesto neposrednog spremanja stanica u inkubator ili omatanjem ploče u foliju propusnu za plinove (Agilent, 2019; Lundholt i sur., 2003). Navedeni rezultati potvrđuju literarne navode vezane za BMP-6 kao pozitivni regulator diferencijacije osteoblasta (Wu i sur., 2016; Vukicevic i Grgurevic, 2009).

Analiza ekspresije diferencijacijskih biljega u skupini tretiranoj samo fluoksetinom je polučila nedosljedne i proturječne rezultate. *Runx2*, *osterix* i *osteopontin* imaju veću promjenu ekspresije u odnosu na kontrolu, dok *osteokalcin* i *kolagen* imaju manju promjenu ekspresije. Od navedenih samo se promjene *Runx2* i *osteokalcina* mogu smatrati statistički značajnima. U usporedbi s kontrolom, u skupini tretiranoj fluoksetinom prosječni udio crvene boje je 2,24 % manji, dok je prosječan intenzitet piksela na ploči bojanjoj na alkalnu fosfatazu 0,13 % veći, a na ploči bojanjoj po von Kossi 0,29 % veći. Razlike nisu statistički značajne u odnosu na kontrolu, ali rezultati bojanja na alkalnu fosfatazu i po von Kossi su bili upravo suprotni rezultatima svih drugih skupina. U svim drugim skupinama povećan je prosječan udio crvene boje i smanjen prosječan intenzitet piksela.

Objekti skupine tretirane s kombinacijom fluoksetina i jednog od BMP proteina pokazale su slične rezultate. U usporedbi s kontrolom, ekspresija gotovo svih ispitivanih gena je povećana, ali porast ekspresije je statistički značajan samo za *osterix* i *osteokalcin*. Što se bojanja na ALP tiče, za obje kombinacije prosječan intenzitet piksela je veći u odnosu na kontrolu, ali taj porast nije statistički značajan, s druge strane, značajno je veći udio crvene boje ( $p < 0,01$ ). Prosječan intenzitet piksela na ploči bojanjoj po von Kossi u usporedbi s kontrolom je 5,6 % manji za kombinaciju s BMP-2 ( $p < 0,05$ ), a 9,5 % manji za kombinaciju s BMP-6 ( $p < 0,005$ ), što ukazuje na pojačanu mineralizaciju. Kad se usporede međusobno skupine tretirane s BMP s fluoksetinom i bez njega vidljivo je da je promjena ekspresije uglavnom veća u skupinama bez fluoksetina. Kod skupina tretiranih s BMP-2 najznačajnije su razlike u ekspresiji *osteopontina*, *osteokalcina* i *Runx2*. Kod skupina tretiranih s BMP-6 značajne su promjene u ekspresiji *osteopontina* i *Runx2*. Promjena *osteokalcina* je veća u skupini tretiranoj s BMP-6 i fluoksetinom, ali s obzirom da se p-vrijednost izrazito razlikuje između rezultata dobivenih prema dva referentna gena i da svi drugi rezultati ukazuju da bolju diferencijaciju stanica u skupini bez fluoksetina, ovdje se vjerojatno radi o pogrešci.

Iako fluoksetin sam nije pokazao značajnu inhibiciju u usporedbi s kontrolnom skupinom, uočena je značajna razlika između skupina tretiranih s BMP proteinima s

fluoksetinom i bez fluoksetina, što upućuje na moguće ometanje BMP signalizacijskih puteva fluoksetinom. Izostanak direktnog učinka fluoksetina na osteoblaste poklapa se s rezultatima iz literature (Ortuño i sur., 2017). Također, već je pokazano da fluoksetin inhibira diferencijaciju osteoblasta i mineralizaciju tijekom regeneracije kosti (Bradaschia-Correa i sur., 2017). Za koštane morfogenetske proteine je poznato da su ključni u regeneraciji kosti, a kao takvi se već primjenjuju i u klinici (Salazar i sur., 2016; Carreira i sur., 2014; Vukicevic i sur., 2014). Stoga, navedene literaturne spoznaje i rezultati ovog rada idu u prilog ideji da fluoksetin inhibira signalizaciju BMP proteinima. Inhibicija učinka BMP-a fluoksetinom je već dokazana u hipokampusu, fluoksetin suprimira ekspresiju BMP-4 i povećava ekspresiju noggina, inhibitora BMP-a (Brooker i sur., 2017). Također je poznato da fluoksetin ublažava degradaciju hrskavice u osteoartritisu inhibicijom Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta, koji je jedan od puteva BMP signalizacije (Miyamoto i sur., 2017). Inhibicija Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta pokazana je i na modelu embrionalnog razvoja miša pri čemu je fluoksetin imao negativan učinak na morfogenezu embrija, a opažen je i citostatični efekt neovisan o Wnt/ $\beta$ -katenin signalnom putu ili SSRI funkciji (Warkus i Marikawa, 2018). Međutim, postoje podaci i o pozitivnom učinku fluoksetina na BMP signalizacijske puteve, pokazano je da u endotelnim stanicama štakora povećava ekspresiju receptora BMPR2 i time uzrokuje protektivni učinak od pulmonarne arterijske hipertenzije za razvoj koje je značajan rizični faktor mutacija u *BMPR2* i inhibicija signalizacije BMP (Wang i sur., 2011). Moguće je da fluoksetin ima različit efekt u različitim tkivima zbog različitih izoformi proteina koji sudjeluju u signalizaciji.

Navedeni mogući mehanizam djelovanja fluoksetina na kosti nije jedini, budući da su u literaturi opisani kratkotrajni antiresorptivni učinak inhibicijom diferencijacije osteoklasta i dugotrajni centralni učinak serotonina koji uzrokuje povećanje simpatičke aktivnosti i suprotstavlja se lokalnom antiresorptivnom učinku (Ferroni i sur., 2019; Ortuño i sur., 2017). Također je pokazano na mišjem modelu da niske doze propranolola normaliziraju simpatičku aktivnost i sprječavaju gubitak koštane mase (Ortuño i sur., 2017). Opisan je i drugi mehanizam, kojim fluoksetin ometa metabolizam sfingolipida u masnom tkivu koštane srži čime dolazi do povećane proizvodnje prostaglandina E2 koji potiče adipocite koštane srži na sekreciju proteina RANKL koji pak promiče osteoklastogenezu (Zhang i sur., 2020). Terapija L-serinom, prekursorom biosinteze sfingolipida, pokazala se uspješnom u prevenciji ubrzanog gubitka koštane mase izazvanim fluoksetinom kod kunića i postmenopauzalnih žena s depresijom (Zhang i sur., 2020). Iako propranolol i L-serin imaju različit mehanizam djelovanja pokazali su se učinkovitima u sprječavanju gubitka koštane mase, ipak, trebalo bi

provjeriti njihovu učinkovitost u sprječavanju usporene regeneracije kosti tijekom terapije fluoksetinom. Ukoliko nemaju djelovanje u takvim slučajevima, trebalo bi razmotriti nove terapijske ciljeve specifične za BMP signalizacijski put i osteoblaste.

## Zaključak

1. Rezultati ovog rada pokazuju da fluoksetin nema značajan učinak na ekspresiju diferencijacijskih biljega osteoblasta u odnosu na kontrolnu skupinu, ali ima inhibitorni učinak na pozitivan učinak koštanih morfogenetskih proteina BMP-2 i BMP-6 na proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta.
2. Fluoksetin vjerojatno nema izravan učinak na osteoblaste, već svoj učinak manifestira inhibicijom signalnih puteva koštanih morfogenetskih proteina BMP-2 i BMP-6.
3. Predloženi učinak fluoksetina objašnjava zašto fluoksetin ima inhibitorni učinak na regeneraciju kostiju *in vivo*, dok u *in vitro* uvjetima njegov utjecaj na osteoblaste nije jednoznačno dokazan.
4. Rasvjetljavanjem točnog mehanizma utjecaja fluoksetina na signalizacijski sustav koštanih morfogenetskih proteina, omogućila bi se uspostava novog terapijskog pristupa za prevenciju usporene regeneracije kostiju nakon frakture, a možda i za sprječavanje gubitka koštane mase uzrokovanog kroničnom terapijom fluoksetinom.

## Literatura

Agilent User Guide. Methods for Reducing Cell Growth Edge Effects in Agilent Seahorse XF Cell Culture Microplates. 2019.

Amarasekara DS, Kim S, Rho J. Regulation of osteoblast differentiation by cytokine networks. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(6), 1–16.

Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2005, 5(2), 209–219.

Balooch G, Balooch M, Nalla RK, Schilling S, Filvaroff EH, Marshall GW, Marshall SJ, Ritchie RO, Derynck R, Alliston T. TGF- $\beta$  regulates the mechanical properties and composition of bone matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(52), 18813–18818.

Begić D, Brečić P, Begovac I, Bokić-Sabolić A, Degmečić D, Hrabak-Žerjavić V, Ivanušić J, Jevtović S, Koić E, Kušan Jukić M, Kozumplik O, Majić G, Mihaljević-Peješ A, Mimica N, Restek Petrović B, Sabljarić Dračevac R, Silorčić Radić M, Šagud M, Štrkalj-Ivezić S, Uzun S, Vuksan-Ćusa B, Živković M. Kliničke smjernice za liječenje depresivnog poremećaja. Hrvatsko psihijatrijsko društvo, 2020, 1–43.

Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine*, 2009, 60, 355–366.

Bradaschia-Correa V, Josephson AM, Mehta D, Mizrahi M, Neibart SS, Liu C, Kennedy O, Castillo AB, Egol KA, Leucht P. FLUOXETINE INHIBITS OSTEOBLAST DIFFERENTIATION & MINERALIZATION IN FRACTURE HEALING: The Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Fluoxetine Directly Inhibits Osteoblast Differentiation and Mineralization During Fracture Healing in Mice. *Physiology & behavior*, 2017, 176(3), 139–148.

Brooker SM, Gobeske KT, Chen J, Peng C, Kessler JA. Hippocampal bone morphogenetic protein signaling mediates behavioral effects of antidepressant treatment. *Molecular Psychiatry*, 2017, 22(6), 910–919.

Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: Facts, challenges, and future perspectives. *Journal of Dental Research*, 2014, 93(4), 335–345.

Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *European Cells and Materials*, 2012, 24, 1–17.

Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *The FASEB Journal*, 1993, 7(15), 1475–1482.

Ducy P, Karsenty G. The two faces of serotonin in bone biology. *Journal of Cell Biology*, 2010, 191(1), 7–13.

Ferroni L, Gardin C, Bellin G, Vindigni V, Pavan C, Zavan B. Effects of novel antidepressant drugs on mesenchymal stem cell physiology. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2019, 114, 108853.

Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 1999, 10(1), 79–98.

Garnero P. The Role of Collagen Organization on the Properties of Bone. *Calcified Tissue International*, 2015, 97(3), 229–240.

Green MR, Sambrook J. Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019, 6, 436–456.

Halloran D, Durbano HW, Nohe A. Developmental review bone morphogenetic protein-2 in development and bone homeostasis. *Journal of Developmental Biology*, 2020, 8(3), 28–30.

HALMED. Sažetak opisa svojstava lijeka - Portal 20 mg tvrde kapsule. 2021, 1–16.

Kasagi S, Chen W. TGF-beta1 on osteoimmunology and the bone component cells. *Cell and Bioscience*, 2013, 3(1), 1–7.

Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. *European Journal of Cancer Care*, 2017, 26(6), 1–5.

Kawane T, Qin X, Jiang Q, Miyazaki T, Komori H, Yoshida CA, Matsuura-Kawata VKS, Sakane C, Matsuo Y, Nagai K, Maeno T, Date Y, Nishimura R, Komori T. Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. *Scientific Reports*, 2018, 8(1), 1–17.

Lavoie B, Lian JB, Mawe GM. Regulation of Bone Metabolism by Serotonin. *Understanding the Gut-Bone Signaling Axis*, 2017, 1033, 35-46.

Lin X, Patil S, Gao Y, Qian A. The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11, 1–15.

Lundholt BK, Scudder KM, Pagliaro L. A simple technique for reducing edge effect in cell-based assays. *Journal of Biomolecular Screening*, 2003, 8(5), 566–570.

Malhi GS, Mann JJ. Depression. *The Lancet*, 2018, 392(10161), 2299–2312.

Manolagas SC. Osteocalcin promotes bone mineralization but is not a hormone. *PLOS Genetics*, 2020, 16(6), 4–7.

Meroni M, Crippa V, Cristofani R, Rusmini P, Cicardi ME, Messi E, Piccolella M, Tedesco

B, Ferrari V, Soraru G, Pennuto M, Poletti A, Galbiati M. Transforming growth factor beta 1 signaling is altered in the spinal cord and muscle of amyotrophic lateral sclerosis mice and patients. *Neurobiology of Aging*, 2019, 82, 48–59.

Miyamoto K, Ohkawara B, Ito M, Masuda A, Hirakawa A, Sakai T, Hiraiwa H, Hamada T, Ishiguro N, Ohno K. Fluoxetine ameliorates cartilage degradation in osteoarthritis by inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *PLoS ONE*, 2017, 12(9), 1–19.

Moser SC, van der Eerden BCJ. Osteocalcin — A versatile bone-derived hormone. *Frontiers in Endocrinology*, 2019, 10, 4–9.

Orimo H. The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *J Nippon Med Sch*, 2010, 77(1).

Ortuño MJ, Robinson ST, Subramanyam P, Paone R, Huang Y, Guo XE, Colecraft HM, Mann JJ, Ducey P. Serotonin reuptake inhibitors act centrally to cause bone loss in mice by counteracting a local antiresorptive effect. *Nat Med*, 2017, 22(10), 1170–1179.

Otsuka F. Multifunctional bone morphogenetic protein system in endocrinology. *Acta Medica Okayama*, 2013, 67(2), 75–86.

Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, 2002, 115(20), 3861–3863.

Parisi L, Toffoli A, Ghezzi B, Mozzoni B, Lumetti S, Macaluso GM. A glance on the role of fibronectin in controlling cell response at biomaterial interface. *Japanese Dental Science Review*, 2020, 56(1), 50–55.

Pauk M, Grgurevic L, Brkljacic J, Kufner V, Bordukalo-Niksic T, Grabusic K, Razdorov G, Rogic D, Zuvic M, Oppermann H, Babitt JL, Lin HY, Volarevic S, Vukicevic S. Exogenous BMP7 corrects plasma iron overload and bone loss in *Bmp6*<sup>-/-</sup> mice. *International Orthopaedics*, 2014, 39(1), 161–172.

*Periodic Reporting for period 2 - OSTEOproSPINE (Novel Bone Regeneration Drug Osteogrow: Therapeutic Solution for Lumbar Back Pain)*.  
<https://cordis.europa.eu/project/id/779340/reporting>, pristupljeno 14.6.2021.

Salazar VS, Gamer LW, Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nature Reviews Endocrinology*, 2016, 12(4), 203–221.

Sansone RA, Sansone LA. SSRIs: Bad to the bone?. *Innovations in Clinical Neuroscience*, 2012, 9(7–8), 42–47.

Schroeder TM, Jensen ED, Westendorf JJ. Runx2 : A Master Organizer of Gene Transcription in Developing and Maturing Osteoblasts. *Birth Defects Research*, 2005, 225, 213–225.

Sinha KM, Zhou X. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *Journal of*



- Cellular Biochemistry*, 2013, 114(5), 975–984.
- Varma S, Orgel JPRO, Schieber JD. Nanomechanics of Type I Collagen. *Biophysical Journal*, 2016, 111(1), 50–56.
- Vukicevic S, Oppermann H, Verbanac D, Jankolija M, Popek I, Curak J, Brkljacic J, Pauk M, Erjavec I, Francetic I, Dumic-Cule I, Jelic M, Durdevic D, Vlahovic T, Novak R, Kufner V, Bordukalo Niksic T, Kozlovic M, Banic Tomisic Z, Bubic-Spoljar J, Bastalic I, Vikic-Topic S, Peric M, Pecina M, Grgurevic L. The clinical use of bone morphogenetic proteins revisited: A novel biocompatible carrier device OSTEOGROW for bone healing. *International Orthopaedics*, 2014, 38(3), 635–647.
- Vukicevic S, Grgurevic L, Erjavec I, Pecin M, Bordukalo-Niksic T, Stokovic N, Lipar M, Capak H, Maticic D, Windhager R, Sampath TK, Gupta M. Autologous blood coagulum is a physiological carrier for BMP6 to induce new bone formation and promote posterolateral lumbar spine fusion in rabbits. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2020, 14(1), 147–159.
- Vukicevic S, Grgurevic L. BMP-6 and mesenchymal stem cell differentiation. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2009, 20(5–6), 441–448.
- Walsh JS, Newell-Price JD, DeBono M, Adaway J, Keevil B, Eastell R. Circulating serotonin and bone density, structure, and turnover in carcinoid syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2013, 98(7), 2902–2907.
- Wang Y, Zhang XH, Wang HL. Involvement of BMPR2 in the protective effect of fluoxetine against monocrotaline-induced endothelial apoptosis in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2011, 89(5), 345–354.
- Warkus ELL, Marikawa Y. Fluoxetine Inhibits Canonical Wnt Signaling to Impair Embryoid Body Morphogenesis: Potential Teratogenic Mechanisms of a Commonly Used Antidepressant. *Toxicological Sciences*, 2018, 165(2), 372–388.
- Wei W, Liu S, Song J, Feng T, Yang R, Cheng Y, Li H, Hao L. MGF-19E peptide promoted proliferation, differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cell and promoted bone defect healing. *Gene*, 2020, 749, 144703.
- WHO. Depression, 2020., <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>  
pristupljeno: 15.6.2021.
- Wu M, Chen G, Li Y. TGF-  $\beta$  and BMP signaling in osteoblast , skeletal development , and bone formation , homeostasis and disease. *Bone Research*, 2016, 4, 16009.
- Zhang C. Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor Osx. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2010, 5(1), 1–7.

Zhang H, Li K, Zhao Y, Zhang Y, Sun J, Li S, Lin G. Long-term use of fluoxetine accelerates bone loss through the disruption of sphingolipids metabolism in bone marrow adipose tissue. *Translational Psychiatry*, 2020, 10(1), 138.

Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New Insights into the Biology of Osteocalcin. *Bone*, 2016, 82, 42–49.

## Sažetak

Uvod: Kronična upotreba fluoksetina u svrhu liječenja depresije povezana je s povećanim rizikom od loma kostiju. Osteoblasti su stanice koje izgrađuju koštani matriks, tj. zaslužne su za rast, razvoj i regeneraciju koštanog tkiva. Koštani morfogenetski proteini potiču proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta. Ovaj rad ispituje učinak fluoksetina na osteoblaste, te zajednički učinak fluoksetina i koštanih morfogenetskih proteina na osteoblaste.

Metode: Stanice preosteoblasta MC3T3-E1 su nasađene na tri ploče i tretirane koštanim morfogenetskim proteinima 2 i 6 u dvije koncentracijske razine, fluoksetinom, te kombinacijom koštanog morfogenetskog proteina i fluoksetina. Iz stanica na prvoj ploči izolirana je RNA i provedena analiza ekspresije odabranih diferencijacijskih markera osteoblasta lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu. Druga ploča je obojana na alkalnu fosfatazu, a treća po von Kossi. Rezultati bojanja su fotografirani, a fotografije su računalno obrađene u svrhu određivanja ekspresije alkalne fosfataze i mineralizacije.

Rezultati: Koštani morfogenetski proteini 2 i 6 su u obje koncentracijske razine pokazali izrazito povećanu ekspresiju svih ispitivanih parametara. Fluoksetin nije pokazao značajan utjecaj na ispitivane parametre. Kombinacija fluoksetina i koštanog morfogenetskog proteina pokazuje pozitivan učinak na diferencijaciju osteoblasta, ali značajno slabiji od samih koštanih morfogenetskih proteina.

Zaključak: Fluoksetin vjerojatno ima inhibitorni učinak na signalizacijske puteve koštanih morfogenetskih proteina čime posredno uzrokuje sporiju regeneraciju fraktura i mikrofraktura kostiju.

## Summary

**Introduction:** Chronic use of fluoxetine for treatment of major depressive disorder is in correlation with increased risk of bone fractures. Osteoblasts are cells that build up bone matrix, ie. they promote growth, development, and regeneration of bone tissue. Bone morphogenetic proteins promote proliferation and differentiation of osteoblasts. This research explores the effect of fluoxetine on osteoblasts, and cumulative effect of fluoxetine and bone morphogenetic protein on osteoblasts.

**Methods:** Preosteoblast cells MC3T3-E1 were seeded on three cell culture plates and treated with bone morphogenetic proteins in two concentration levels, fluoxetine, and combination of bone morphogenetic protein and fluoxetine. From the first plate, RNA was isolated to conduct analysis of expression of selected differentiation markers of osteoblasts via real-time polymerase chain reaction. Second plate was stained for alkaline phosphatase, and the third one was stained by von Kossa method. Results of staining were photographed, and expression of alkaline phosphatase and mineralization was determined via computer analysis of photographs.

**Results:** Bone morphogenetic proteins 2 and 6 in both concentration levels caused significant increase of expression of all inquired parameters. Fluoxetine did not show significant impact on inquired parameters. Combination of fluoxetine and bone morphogenetic protein showed positive effect on differentiation of osteoblasts, but this effect was significantly weaker than the effect of bone morphogenetic proteins alone.

**Conclusion:** Fluoxetine likely has inhibitory impact on signalization pathways of bone morphogenetic proteins, whereby indirectly inhibits regeneration of bone fractures and microfractures.

## Popis kratica

5HTT – 5-hidroksitriptaminski prijenosnik

ACTB –  $\beta$ -aktin

ALP – alkalna fosfataza, od engl. *alkaline phosphatase*

ATF4 – aktivacijski transkripcijski faktor 4

BMP – koštani morfogenetski protein, od engl. *bone morphogenetic protein*

BSP – koštani sijaloprotein, od engl. *bone sialoprotein*

cDNA – komplementarna DNA, od engl. *complementary DNA*

CREB – protein koji veže cAMP responsivni element od engl. *cAMP-response element binding protein*

COL1A1 – kolagen tip 1 lanac alfa 1

DNA – deoksiribonukleinska kiselina, od engl. *deoxyribonucleic acid*

ECM – izvanstanični matriks, od engl. *extracellular matrix*

FBS – goveđi fetalni serum, od engl. *fetal bovine serum*

FDA – Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država, od engl. *Food and Drug Administration*

FGF – faktor rasta fibroblasta, od engl. *fibroblast growth factor*

GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, od engl. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GPI – glikozilfosfatidilinozitol, od engl. *glycosylphosphatidylinositol*

HALMED – Agencija za lijekove i medicinske proizvode

Hh – Hedgehog

MSC – mezenhimske matične stanice, od engl. *mesenchymal stem cells*

OCN – osteokalcin, od engl. *osteocalcin*

ONN – osteonektin

OSN – osteopontin

OSX – osterix

PBS – fosfatni pufer, od engl. *phosphate saline buffer*

PCR – lančana reakcija polimeraze, od engl. *polymerase chain reaction*

PTH – paratiroidni hormon

RNA – ribonukleinska kiselina, od engl. *ribonucleic acid*

RT-PCR – PCR u stvarnom vremenu, od engl. *real-time PCR*

RUNX2 – runtu srodan transkripcijski faktor 2, od engl. *runt-related transcription factor 2*

SATB2 – specijalni protein koji veže slijedove bogate AT, 2, od engl. *special AT-rich sequence-binding protein 2*

SSRI – selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina, od engl. *selective serotonin reuptake inhibitors*

TGF- $\beta$  – transformirajući čimbenik rasta  $\beta$ , od engl. *transforming growth factor  $\beta$*

WHO – svjetska zdravstvena organizacija, od engl. *world health organisation*

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### **UTJECAJ BMP-2, BMP-6 I FLUOKSETINA NA EKSPRESIJU DIFERENCIJACIJSKIH BILJEGA OSTEUBLASTA U KULTURI STANICA MC3T3-E1**

**Nikolina Martinčić**

#### **SAŽETAK**

**Uvod:** Kronična upotreba fluoksetina u svrhu liječenja depresije povezana je s povećanim rizikom od loma kostiju. Osteoblasti su stanice koje izgrađuju koštani matriks, tj. zaslužne su za rast, razvoj i regeneraciju koštanog tkiva. Koštani morfogenetski proteini potiču proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta. Ovaj rad ispituje učinak fluoksetina na osteoblaste, te zajednički učinak fluoksetina i koštanih morfogenetskih proteina na osteoblaste.

**Metode:** Stanice preosteoblasta MC3T3-E1 su nasadene na tri ploče i tretirane koštanim morfogenetskim proteinima 2 i 6 u dvije koncentracijske razine, fluoksetinom, te kombinacijom koštanog morfogenetskog proteina i fluoksetina. Iz stanica na prvoj ploči izolirana je RNA i provedena analiza ekspresije odabranih diferencijacijskih markera osteoblasta lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu. Druga ploča je obojana na alkalnu fosfatazu, a treća po von Kossi. Rezultati bojanja su fotografirani, a fotografije su računalno obrađene u svrhu određivanja ekspresije alkalne fosfataze i mineralizacije.

**Rezultati:** Koštani morfogenetski proteini 2 i 6 su u obje koncentracijske razine pokazali izrazito povećanu ekspresiju svih ispitivanih parametara. Fluoksetin nije pokazao značajan utjecaj na ispitivane parametre. Kombinacija fluoksetina i koštanog morfogenetskog proteina pokazuje pozitivan učinak na diferencijaciju osteoblasta, ali značajno slabiji od samih koštanih morfogenetskih proteina.

**Zaključak:** Fluoksetin vjerojatno ima inhibitorski učinak na signalizacijske puteve koštanih morfogenetskih proteina čime posredno uzrokuje sporiju regeneraciju fraktura i mikrofraktura kostiju.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 42 stranice, 6 grafičkih prikaza, 9 tablica i 53 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: BMP-2, BMP-6, fluoksetin, SSRI, osteoblasti

Mentor: **Dr. sc. Donatella Verbanac**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Slobodan Vukičević**, *akademik i redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Donatella Verbanac**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Slobodan Vukičević**, *akademik i redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.*

**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: kolovoz 2021.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical Biochemistry  
Department of Medical Biochemistry and Hematology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### IMPACT OF BMP-2, BMP-6, AND FLUOXETINE ON EXPRESSION OF OSTEOBLAST DIFFERENTIATION MARKERS IN MC3T3-E1 CELL CULTURE

**Nikolina Martinčić**

#### SUMMARY

**Introduction:** Chronic use of fluoxetine for treatment of major depressive disorder is in correlation with increased risk of bone fractures. Osteoblasts are cells that build up bone matrix, ie. they promote growth, development, and regeneration of bone tissue. Bone morphogenetic proteins promote proliferation and differentiation of osteoblasts. This research explores the effect of fluoxetine on osteoblasts, and cumulative effect of fluoxetine and bone morphogenetic protein on osteoblasts.

**Methods:** Preosteoblast cells MC3T3-E1 were seeded on three cell culture plates and treated with bone morphogenetic proteins in two concentration levels, fluoxetine, and combination of bone morphogenetic protein and fluoxetine. From the first plate, RNA was isolated to conduct analysis of expression of selected differentiation markers of osteoblasts via real-time polymerase chain reaction. Second plate was stained for alkaline phosphatase, and the third one was stained by von Kossa method. Results of staining were photographed, and expression of alkaline phosphatase and mineralization was determined via computer analysis of photographs.

**Results:** Bone morphogenetic proteins 2 and 6 in both concentration levels caused significant increase of expression of all inquired parameters. Fluoxetine did not show significant impact on inquired parameters. Combination of fluoxetine and bone morphogenetic protein showed positive effect on differentiation of osteoblasts, but this effect was significantly weaker than the effect of bone morphogenetic proteins alone.

**Conclusion:** Fluoxetine likely has inhibitory impact on signalization pathways of bone morphogenetic proteins, whereby indirectly inhibits regeneration of bone fractures and microfractures.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 42 pages, 6 figures, 9 tables and 53 references. Original is in Croatian language.

**Keywords:** BMP-2, BMP-6, fluoxetine, SSRI, osteoblasts

**Mentor:** **Donatella Verbanac, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Slobodan Vukičević, Ph.D.** Academician and Full Professor, University of Zagreb School of Medicine

**Reviewers:** **Donatella Verbanac, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Slobodan Vukičević, Ph.D.** Academician and Full Professor, University of Zagreb School of Medicine  
**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2021